

Aus der Abteilung für Klinische Endokrinologie
(Leiter: Prof. Dr. med. E. F. Pfeiffer)
der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt/Main
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff)

Säulenchromatographische Fraktionierung der 17-Ketosteroide gesunder Frauen in Ruhe und unter ACTH-Belastung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Ruth Müller-Ruchholtz
aus Kiel

1965

1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546410_0030



Aus der Abteilung für Klinische Endokrinologie
(Leiter: Prof. Dr. med. E. F. Pfeiffer)
der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt/Main
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff)

Säulenchromatographische Fraktionierung der 17-Ketosteroide gesunder Frauen in Ruhe und unter ACTH-Belastung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin der
Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Ruth Müller-Ruchholtz
aus Kiel

Dekan : Prof.Dr.med.O.Käser
Referent : Prof.Dr.med.E.F.Pfeiffer
Korreferent : Prof.Dr.med.H.K.Brehm
Mündliche Prüfung : am 7.November 1966

Disposition

	Seite
Einleitung	1
Fragestellung	2
Die Hormone der Nebennierenrinde	3
Biosynthese und Metabolismus	5
Steuerung der Steroidproduktion	8
Methodik	10
Untersuchungsgang	10
Bestimmung der Gesamtcorticoide	11
Bestimmung der 17-Ketosteroide	13
Säulenchromatograph. Trennung der 17-Ketosteroide	15
a. Aufarbeitung des 24-Stunden-Harns	16
b. Säulenchromatographie	17
c. Identifikation der einzelnen Steroide	19
d. Reproduzierbarkeit	20
e. Mengenberechnung der 17-Ketosteroid- Fraktionen	20
Statistische Auswertung der Ergebnisse	21
Ergebnisse	22
Gesamtcorticoide	22
17-Ketosteroide	22
Säulenchromatograph. Trennung der 17-Ketosteroide	23
Androsteron/Ätiocholanolon-Quotient	28
Diskussion	30
Einflüsse auf die Steroid-Hormon- Ausscheidung	30
Hydrolyse	32

Säulenchromatographische Fraktionierung	34
Gesamtcorticoid-Ausscheidung	36
17-Ketosteroid-Ausscheidung	36
Säulenchrom. Fraktionen der 17-Ketosteroide	37
Androsteron/Ätiocholanolon-Quotient	40
17-Ketosteroid-Fraktionen unter ACTH-Belastung	41
Schlußfolgerung	44
Zusammenfassung	45
Tabellen	47
Abbildungen	68,69
Literaturverzeichnis	70

Einleitung

Die beiden Grundelemente der Steuerung des Organismus sind das vegetative Nervensystem und die Drüsen mit innerer Sekretion. Das Zwischenhirn-Hypophysen-System nimmt dabei eine zentrale Reglerstellung ein. Es ist durch die glandotropen Hormone des Hypophysenvorderlappens mit den verschiedenen Hormondrüsen zu Funktionskreisen (HOFF) zusammengeschlossen. So kommt es zu intensiven Wechselwirkungen.

Nur selten ist daher auf die Dauer ausschließlich die Tätigkeit einer einzigen Drüse im Sinne einer Über- oder Unterfunktion beeinträchtigt. Meist entstehen Krankheitsbilder mit Verschiebungen des Hormongleichgewichts. Sie verlangen eine sorgfältige Diagnostik, ohne die keine Therapie, vor allem keine differente Hormontherapie durchgeführt werden kann. Mit Hilfe chemischer Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hormonen in Körperflüssigkeiten ist es möglich, die klinische Beobachtung zu kontrollieren und zu ergänzen.

An der Aufklärung der intakten und der gestörten Hormonproduktion des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems und der Entwicklung einer exakten Nebennierenrinden-Funktionsdiagnostik wurde besonders intensiv und erfolgreich gearbeitet. Es ist heute möglich, die funktionelle Leistung und Reserve der Nebennierenrinde zuverlässig zu bestimmen. Man kann so das Ausmaß der Funktionsbeeinträchtigung definieren und mit der angemessenen Dosis geeigneter Hormone korrigieren (PFEIFFER, 1959, 1961).

Aus einer Vielzahl von Funktionsprüfungen müssen zur gezielten Diagnostik im klinischen Labora-

torium die zweckmäßigsten Verfahren ausgewählt werden. Die Bestimmung der 17-Ketosteroide und der Corticosteroide aus dem 24-Stunden-Harn nimmt seit Jahren einen festen Platz in der Nebennierenrinden-Diagnostik ein. Da aber die Schwankungsbreite der Normalwerte groß ist, und die Übergänge zwischen Konstitutionsvarianten und echten endokrinen Störungen fließend sind, reichen diese Bestimmungen unter Ruhebedingungen oft nicht aus, um festzustellen, ob ein behandlungsbedürftiges innersekretorisches Leiden vorliegt. In solchen Fällen ist es notwendig, die Nebennierenrinde (NNR) durch Belastung mit adrenocorticotropem Hormon (ACTH) anzuregen und so ihre funktionelle Reserve zu erfassen. Für die Differentialdiagnose zwischen hyperplasie- und tumorbedingten Störungen der NNR-Funktion ist die ACTH-Belastungsprobe unerlässlich.

Die 17-Ketosteroide, die bei der Summenbestimmung im Harn erfaßt werden, sind von unterschiedlicher Herkunft und verschiedener biologischer Wirksamkeit. Durch ihre chromatographische Trennung gewinnt man einen Einblick in den Steroidhormonstoffwechsel und kann Rückschlüsse auf die Produktion einzelner NNR-Hormone ziehen. Die Fraktionierung ist besonders wertvoll bei der Differentialdiagnose von Überfunktionszuständen der NNR und bei Zustandsbildern mit Verdacht auf adrenocorticale Fehlleistung ohne Vermehrung der Gesamtsteroidausscheidung.

Fragestellung

Aufgabe dieser Arbeit war es, mitzuhelfen, eine geeignete Methode der säulenchromatographischen Fraktionierung der 17-Ketosteroide als Routine-

Verfahren in das klinische Hormonlaboratorium einzuführen.

Die 17-Ketosteroide endokrin gesunder Frauen, deren Gesamtcorticoid- und 17-Ketosteroidausscheidung im Harn in Ruhe und unter ACTH-Belastung normal waren, wurden säulenchromatographisch getrennt, um für diese Methode die Normalwerte der einzelnen Fraktionen zu ermitteln.

Es sollte festgestellt werden, wie sich die einzelnen Fraktionen unter ACTH-Belastung verhalten, insbesondere, ob sich ihre prozentuale Verteilung ändert. Dabei war auch das Verhältnis von Androsteron zu Ätiocholanolon (A/X-Quotient) in Ruhe und unter ACTH-Belastung zu untersuchen.

Anschließend wurde zu der Frage, wie weit eine chromatographische Fraktionierung der 17-Ketosteroide unter ACTH-Belastung von klinisch-diagnostischer Bedeutung sein kann, Stellung genommen.

Diese Versuche dienten als Vorarbeit für differential-diagnostische Untersuchungen bei Frauen mit Verdacht auf Nebennierenrinden-Funktionsstörungen.

Die Hormone der Nebennierenrinde

Der Darstellung der eigenen Methode sollen zum besseren Verständnis einige allgemeine Bemerkungen über Struktur, Synthese, Metabolismus und Steuerung der NNR-Hormone vorausgeschickt werden.

BARTHOLOMAEUS CUSTACHIDIS SANCTOHELYRHINUS beschrieb erstmals in einer Abhandlung "de glandulis qui renibus incumbunt" aus dem Jahre 1553 die

Nebennieren als Organe. THOMAS ADDISON berichtete 1855 über die Symptome des Nebennierenrindenausfalls. Ein Jahr später zeigte BROTH-SJÖGÅRD im Tierversuch, daß die Entfernung beider Nebennieren zum Tode führt. Als erste stellten ROGOFF und STEWART und SWINGLE und PFIFFNER (1927-31) fest, daß bilateral adrenalektomierte Tiere durch Injektion von Nebennierenrindenextrakt am Leben erhalten werden können. Die Reinigung der Extrakte und die Gewinnung kristalliner Substanzen gelangen in den folgenden Jahren vor allem den Arbeitsgruppen um REICHSTEIN, KENDALL, WINTERSTEINER und PFIFFNER (WINTERSTEINER u. PFIFFNER, 1935; REICHSTEIN, 1937; 1938; MASON et al., 1938; KENDALL, 1938; PFIFFNER, 1942; REICHSTEIN u. SHOPPEE, 1943; SIMPSON et al., 1954 a,b,c; siehe auch ZIMMERMANN, 1955 b; DORFMAN u. SHIPLEY, 1956; FIESER u. FIESER, 1961).

Inzwischen wurden mehr als vierzig verschiedene Substanzen aus der NNR isoliert und ihre Konstitution aufgeklärt. Sie gehören sämtlich, ebenso wie die Keimdrüsenhormone zur Gruppe der Steroide. Ihr gemeinsames Grundgerüst ist das Steran (Cyclopentano-perhydrophenanthren), ein gesättigter zyklischer Kohlenwasserstoff.

Sieben Hormone haben charakteristische Wirkungen auf den Salz-, Wasser-, Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel und stellen die Gruppe der biologisch wichtigen Corticosteroide dar. Sie gehören zu den Steroiden mit 21 C-Atomen, die sich chemisch-systematisch vom Pregnan ableiten: Corticosteron (Pregna-4-en-11 β , 21-diol-3, 20-dion), Cortisol (Pregna-4-en-11 β , 17 α , 21-triol-3, 20-dion), Cortison (Pregna-4-en-17 α -21-diol-3, 11, 20-trion),

Cortexolon (Pregna-4-en-17 α -21-diol-3,20-dion), 11-Dehydrocorticosteron (Pregna-4-en-21-ol-3,11,20-trion), Cortexon (Pregna-4-en-21-ol-3,20-diol), und Aldosteron (Pregna-4-en-11 β ,21-diol-3,20-dion-18-al).

Neben den Corticosteroiden wurden aus der NNR biologisch aktive Substanzen mit androgenen und östrogenen Eigenschaften isoliert. Die wichtigsten sind: die Androgene Testosteron (Androsta-4-en-17 β -ol-3-on), Dehydroepiandrosteron (DHA) (Androsta-5-en-3 β -ol-17-on), Androstendion (Androsta-4-en-3,17-dion), 11-Hydroxyandrostendion (Androsta-4-en-11 β -ol-3,17-dion) und Adrenosteron (Androsta-4-en-3,11,17-trion). Sie haben 19 C-Atome und sind Ätiocholan- bzw. Androstan-Derivate. Ihnen gemeinsam ist die Ketogruppe am C-Atom 17. Die Östrogene der NNR Östron (Östra-1,3,5-trien-3-ol-17-on) und Östradiol (Östra-1,3,5-trien-3,17 β -diol) sind phenolische Steroide mit 18 C-Atomen, die sich vom Östran ableiten.

Die Biosynthese der Nebennierenrinden-Steroide wurde durch Perfusion von isolierten Nebennieren, Inkubation von Gewebsschnitten und Homogenaten, Isotopenmarkierung und Untersuchung von Nebennierenvenenblut weitgehend aufgeklärt (Lit.übers.: DORFMAN u. SHIPLEY, 1956; DORFMAN, 1959; HÜBENER u. STAIB, 1965). Durch diese Untersuchungen wissen wir, daß die NNR aus den einfachen Molekülen des Acetats ihre Hormone aufbauen kann. Dazu stehen ihr Enzymsysteme zur Verfügung, von denen jedes durch seine spezifische Wirkung das Substrat für den nächsten Syntheseschritt liefert.

Ausgehend von C₂-Fragmenten der "aktivierten Essigsäure" über Mevalonsäure, biologisches Iso-

pren, Squalen und Lanosterin entsteht Cholesterin (Cholesta-5-en-3 β -ol). Es wird in der NNR gespeichert und dient als Ausgangssubstanz der Steroidhormon-Synthese. Nach Hydroxylierung an C₂₀ und Abspaltung der Seitenkette an dieser Stelle, wird aus dem Cholesterin das erste C₂₁-Steroid, das Pregnenolon (Pregna-5-en-3 β -ol-20-on) gebildet (SABA u. HECHTER, 1955). Dieses wird zu Progesteron (Pregna-4-en-3,20-dion) umgewandelt, der Schlüsselsubstanz in der Biosynthese der Steroidhormone (LEVY et al. 1954). Eine wesentliche Rolle bei allen weiteren Schritten spielen Hydroxylierungs-Reaktionen, bei denen unter stereospezifischer Einführung von molekularem Sauerstoff ein an ein C-Atom gebundenes Wasserstoffatom direkt durch eine Hydroxylgruppe ersetzt wird (HAYANO et al., 1956).

Die Corticosteroide werden durch stufenweise Hydroxylierung an C₁₇, C₂₁ und C₁₁ aus dem Progesteron aufgebaut. Das Endprodukt Cortisol kann durch Dehydrierung an C₁₁ zum Cortison umgewandelt werden. Unterbleibt in der genannten Reaktionsfolge die Einführung einer Hydroxylgruppe an C₁₇, so entsteht (über Desoxycorticosteron) Corticosteron und durch Einführung einer Aldehydgruppe an C₁₈ Aldosteron (MULROW u. COHN, 1959). Eine nachträgliche Hydroxylierung an C₁₇ wird durch die C₂₁-Hydroxylgruppe blockiert (HECHTER u. PINCUS, 1954; LOMBARDO u. HUDSON, 1959; WETTSTEIN, 1960).

Die Androgene der NNR können auf verschiedenen Wegen aufgebaut werden (DORFMAN, 1959; FORCHIELLI, 1962): Die Synthese von Androstendion und Testosteron, bzw. 11-Hydroxyandrostendion durch

Abspaltung der Seitenkette von 17-Hydroxyprogesteron wurde an menschlichem NNR-Gewebe nachgewiesen. Aus Cortisol entsteht über 11-Hydroxyandrostendion Adrenosteron. Die Bildung von DHA aus Pregnenolon über 17-Hydroxypregnenolon durch Abspaltung der Seitenkette, und die Umlagerung von DHA zu Androstendion ist in der menschlichen NNR möglich (GOLDSTEIN et al. 1960). In inkubiertem Tumorgewebe entstand DHA auch direkt aus Cholesterin durch Abspaltung der Seitenkette an C₁₇ (DORFMAN, 1959).

Die Biosynthese der Östrogene geht von androgenen Vorstufen aus (DORFMAN, 1959; HÜBENER u. STAIB, 1965): In der NNR entsteht aus Androstendion Östren und aus Testosteron über 19-Hydroxytestosteron Östradiol.

Chemisch unveränderte und biologisch voll wirksame Steroidhormone werden nur in Spuren ausgeschieden. Ihr Abbau und ihre Inaktivierung vollziehen sich größtenteils in der Leber. Die Metaboliten werden überwiegend an Glucuronsäure oder Schwefelsäure gekoppelt. Die wasserlöslichen Steroidkonjugate werden zum größten Teil durch die Nieren ausgeschieden, ein geringer Teil durch die Galle und den Darm.

Die C₂₁-Steroide werden durch Reduktion der 4-en-3-on-Gruppe zu den entsprechenden Di- und Tetrahydroverbindungen umgewandelt, die den größten Teil der Corticoid-Metaboliten im Harn darstellen. Die 11 β -Hydroxy- kann zur 11-Keto-Gruppe oxydiert werden. Die Reduktion der 20-Keto-Gruppe führt zu 20 α - und 20 β -Hydroxysteroiden. Bei einem Teil der Corticosteroide mit einer Hydroxylgruppe an C₁₇ wird die Seitenkette oxydativ abge-

spalten; dadurch entstehen 11-Hydroxy- und 11-Keto-17-Ketosteroide der Androstan- bzw. Ätiocholanreihe.

Die Androgene der NNR und der Gonaden werden als neutrale 17-Ketosteroide oder als neutrale alkoholische C₁₉-Steroide ausgeschieden. DHA kann unverändert, nur mit Schwefelsäure verestert, zur Ausscheidung gelangen.

Die Abbauprodukte der östrogen wirksamen Steroide werden im Harn als phenolische C₁₈-Steroide nachgewiesen. Sie stammen zum größten Teil von den Östrogenen der Ovarien und der Testes. Die NNR-Östrogene steuern nur einen ganz geringen Teil bei.

Die Steuerung der Steroidhormonproduktion in der NNR wird von zwei weitgehend voneinander unabhängigen Regelkreisen beeinflusst.

Die Synthese und Sekretion der Glucocorticoide und der Androgene wird durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) (LI et al., 1943; SAYERS et al., 1943) des Hypophysenvorderlappens (HVL) angeregt (Übersicht bei TAMM, 1961; BIERICH et al., 1962; HOFF, 1962; HÜBENER u. STAIB, 1965). Das Grundprinzip dieser Steuerung ist ein sog. Rückkoppelungssystem (SAYERS u. SAYERS, 1948). Der ACTH-releasing-factor (CRF), ein vom Hypothalamus an das hypophysäre Pfortadersystem abgegebenes Neurohormon, stimuliert im HVL die Bildung und Ausschüttung des ACTH (SAFFRAN u. SCHALLEY, 1955); (SAFFRAN et al., 1955; GUILLEMIN u. ROSENBERG, 1955; GUILLEMIN u. SCHALLEY, 1959; GUILLEMIN et al., 1959; CRITCHLOW et al., 1963; BRODISH, 1963; HARRIS, 1965; GUILLEMIN, 1965). Dieses steigert auf humoralem Weg die Hormonsynthese in den bei-

den Innenschichten der NNR. Dabei beeinflusst es die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnencien, indem es den Zutritt von Substraten in die NNR-Zellen fördert (STONE u. HECHTER, 1954; SABA, 1960). Der erhöhte Plasmaspiegel des freien, nicht an α_2 -Globulin (Transcortin) gebundenen Cortisols, hemmt die Abgabe des CRF und des ACTH (DORFMAN, 1957; DAVIDSON u. FELDMAN, 1963; HODGES u. JONES, 1963). Ein erhöhter ACTH-Spiegel im Blut verhindert auch von sich aus die ACTH-Ausschüttung aus dem NVL, möglicherweise ebenfalls über eine Beeinflussung des CRF.

Über die Steuerung der Mineralocorticoidsekretion (Aldosteron) der NNR herrscht noch keine völlige Klarheit. Sie scheint weitgehend hypophysenunabhängig zu sein (CRABBE et al., 1959) und untersteht mehreren Regulationsmechanismen (HÜBENER u. STAIB, 1965). Ein veränderter Natrium/Kalium-Quotient beeinflusst direkt die Zellen der Zona glomerulosa der NNR; intravasaler Flüssigkeitsverlust bewirkt über Barorezeptoren (z.B. in der A. Carotis communis) eine Steigerung der Aldosteronsekretion, möglicherweise über ein Neurohormon der Epiphyse, das Glomerulotropin (GTH) (FARRELL, 1960; FARRELL u. ISAAC, 1961; FARRELL u. TAYLOR, 1962). Führt die Abnahme der intravasalen Flüssigkeitsmenge zur Drasselung der Nierendurchblutung, dann erfolgt die Sekretionssteigerung wahrscheinlich über das Renin-Hypertensinsystem (GROSS, 1958; GENEST, 1961; MULROW et al., 1962, 1963; SLATER et al., 1963; BRYAN et al., 1964).

Methodik der Gesamtcorticoid- und
17-Ketosteroidbestimmung im Harn
und der säulenchromatographischen
Trennung der 17-Ketosteroide

Bei 14 endokrin gesunden Frauen im Alter von 17-46 Jahren wurde die 24-Stunden-Ausscheidung der Gesamtcorticoide und der 17-Ketosteroide bestimmt und eine chromatographische Fraktionierung der 17-Ketosteroide durchgeführt. Dabei wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

1. Untersuchung des 24-Stunden-Sammelharns, teilweise an 2 Tagen (Ruheausscheidung)
2. Untersuchung des 24-Stunden-Sammelharns bei Belastung mit 25 IE ACTH in 500 ml Glucoselösung als intravenöse Tropfinfusion über 8 Stunden (1. ACTH-Tag)
3. Untersuchung des 24-Stunden-Sammelharns bei Wiederholung der ACTH-Belastung in der gleichen Weise (2. ACTH-Tag)

Diese Untersuchungen wurden an 3 bzw. 4 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Zur Kontrolle für die Vollständigkeit des 24-Stunden-Harns wurden das spezifische Gewicht und die Kreatinin-Ausscheidung gemessen.

Während der Sammelzeit wurde der Harn im Kühlschrank aufbewahrt und dann sofort verarbeitet, so daß keine besonderen Konservierungsmaßnahmen notwendig waren.

Die Bestimmung der Gesamtcorticoide

Da die Corticosteroide mehrere labile Molekülgruppierungen haben, gibt es zahlreiche Möglichkeiten, sie durch mehr oder weniger spezifische Gruppenreaktionen quantitativ zu bestimmen (Übersicht bei ZIMMERMANN, 1956a; RAFTOPCULO et al., 1959; STAIB, 1962; PERON, 1962; TAMM, 1963).

Die Methode von STAUDINGER und SCHMEISSER (1948), modifiziert von STAUDINGER und BAUER (1954) hat sich im Hormonlaboratorium der Abt. f. allg. Endokrinologie an der 1. Med. Univ. Klinik Frankfurt bewährt. Sie beruht auf der Fermenthydrolyse der an Glucuronsäure gebundenen Corticoide bei gleichzeitiger Dialyse gegen Wasser und Chloroform und anschließender Farbreaktion. Grundlage der Farbreaktion ist die reduzierende Wirkung der Corticoide mit unversehrter Seitenkette am C-Atom-17. Farblöse Phosphormolybdänsäure wird zu Phosphormolybdänblau reduziert, dessen Farbintensität proportional der Steroidkonzentration ist. Durch den Vergleich mit der Farbstoffbildung nach Zerstörung der Seitenkette wird die spezifische Reduktion der Ketol-Seitenkette an C₁₇ bestimmt.

20 ml des gut gemischten 24-Stunden-Sammelharns wurden zur Inaktivierung proteolytischer Fermente, die die Hydrolyse stören, kurz aufgekocht. Der abgekühlte Harn wurde mit Eisessig und Natriumacetat auf pH 4.5 - das Wirkungsoptimum der β -Glucuronidase - eingestellt, mit 2000 FISHMAN-Einheiten β -Glucuronidase versetzt und in einen Dialysierschlauch gefüllt. Die Dialyse erfolgte gegen 40 ml Natriumacetatpuffer (pH 4.5) und 20 ml Chloroform

während 72-stündiger Inkubation des Ansatzes bei 37° C. Nach jeweils 24 Stunden wurde die Dialysierflüssigkeit erneuert, die Dialysate vereinigt und im Kühlschrank aufbewahrt, um anschließend viermal mit je 20 ml Chloroform in einem Scheidetrichter extrahiert zu werden. Nachdem der wässrige Anteil verworfen und der Chloroformauszug nacheinander mit je 10 ml n/2 Natronlauge und n/10 Schwefelsäure gewaschen, mit einer Spatelspitze Natriumsulfat getrocknet und filtriert war, wurde in zwei Schliffkölbchen (Kölbchen A und B) je die Hälfte des Chloroform-Steroid-Extraktes im Wasserbad von 40 - 50° C im Vakuum eingedampft. Um den Farbleerwert zu ermitteln, mußte die Ketol-Seitenkette der Corticoide im Kölbchen A durch einstündiges Kochen im Wasserbad unter Zugabe von 2 ml n/10 Natronlauge zerstört werden. Der Extrakt wurde mit 2.5 ml n/10 Essigsäure neutralisiert und zur Trockne gebracht. Von dem in je 5 ml Eisessig aufgelösten Trockenrückstand beider Kölbchen wurden je 4 ml in zwei Reaganzgläser pipettiert und 0,5 ml des frisch zubereiteten Farbreagenzes zugefügt. (Das Farbreagenz hatte folgende Zusammensetzung: Lösung I: 14.6 g Molybdänsäureanhydrid, 18.0 g Natronlauge, 50 ml aqua dest.; Lösung II: 32.0 ml 85%ige Phosphorsäure, 18.0 ml 45%ige Schwefelsäure. Ein Teil Lösung I und vier Teile Lösung II sind unmittelbar vor dem Gebrauch zu mischen). Die Reaganzgläser wurden mit Zellstoffstopfen verschlossen und eine Stunde lang in siedendem Wasser erhitzt. Nach Abkühlen in kaltem Wasser wurden die Ansätze mit Eisessig auf je 5 ml aufgefüllt, filtriert, und die Extinktion am Photometer Elco II (Zeiss) mit dem Filter SE 72 in

Kuvetten von 10 mm Schichtdicke gemessen. Dabei gab die Extinktionsdifferenz von Farbleerwert und Hauptprobe das Reduktionsvermögen der Ketol-Seitenkette an. Mit Hilfe einer Desoxycorticosteron-Eichkurve wurde die 24-Stunden-Ausscheidung berechnet.

Die Bestimmung der 17-Ketosteroide

Das Prinzip der Bestimmung der gesamten neutralen 17-Ketosteroide beruht auf der Ausbildung eines Farbkomplexes zwischen Methylenketogruppen und Polynitrokörpern in alkalischem Milieu. JAFFE gab 1886 diese Reaktion erstmals zur Bestimmung von Kreatinin mit Pikrinsäure und NaOH an. ZIMMERMANN führte sie 1935 zur quantitativen Erfassung der 17-Ketosteroide im Harn ein. 17-Ketosteroide bilden mit m-Dinitrobenzol in Kalilauge einen violettroten Farbkomplex, das sog. ZIMMERMANN-Chromogen, das mit Äther ausgeschüttelt, photometrisch bestimmt werden kann.

Es sind zahlreiche Modifikationen der ZIMMERMANN'schen Methode entwickelt worden, da das Verfahren in gewissen Grenzen, die durch die Reaktionsgeschwindigkeit gegeben sind, weitgehend variiert werden kann. Die bekanntesten Modifikationen sind vor allem diejenige von CALLOW, CALLOW und EMMENS (1938) und die von HOLTGREFF und KOCH (1940). Auch die verschiedenen Mikromethoden gehen im allgemeinen auf eine dieser Modifikationen zurück. ZIMMERMANN selbst hat darauf hingewiesen (1955a), daß bei einem Vergleich all dieser Modifikationen mit der Origin-

nalmethode weitgehende Gleichwertigkeit besteht und die Bevorzugung der einen oder der anderen mehr von persönlichen Gewohnheiten als von sachlichen Gründen abhängig zu sein scheint.

Die ZIMMERMANN'sche Dinitrobenzol-Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

50 ml eines gut gemischten 24-Stunden-Sammelharns wurden mit 5 ml konzentrierten Salzsäure (D1.16) 15 Minuten lang am Rückflußkühler bei 100° C hydrolysiert und nach Abkühlung in einem Scheidetrichter 3mal mit 25 - 30 ml Äther kräftig geschüttelt. Die Ätherextrakte wurden vereinigt und 3mal mit je 20 ml 10%iger Natronlauge von Pigmenten und phenolischen Steroiden gereinigt, durch 3maliges Waschen mit je etwa 50 ml aqua dest. neutralisiert und bei 60° C zur Trockne eingedampft.

Der Trockenrückstand enthielt die gesamten neutralen 17-Ketosteroide. Er wurde in 5 ml absolutem Äthanol gelöst und je 2 ml für den Hauptwert (a) und den Urinleerwert (b) abgenommen. Der Hauptwert wurde mit gleichen Volumina einer 2%igen alkoholischen Dinitrobenzollösung und einer 3-n wässrigen Kalilauge gut gemischt, der Urinleerwert mit 2 ml absolutem Äthanol und 2 ml 3-n wässriger Kalilauge. Ein Reagenzienfarbwert (c) bestand aus je 2 ml absolutem Äthanol, 2%iger Dinitrobenzollösung und 3-n wässriger Kalilauge. Die Ansätze verblieben für 60 Minuten in einem Wasserbad in einem abgedunkelten Thermostaten von 25 $\pm$ 1° C. Zeit und Temperatur wurden bei allen Vorgängen genau eingehalten, da die Farbentwicklung davon abhängig ist.

Das spezifische ZIMMERMANN-Chromogen wurde mit 8 ml Äther (p.A.) extrahiert. Durch Filtration durch ein weiches Papierfilter konnte die Trennung von der wässrigen Phase, die die störenden Chromogene enthält, beschleunigt und die ätherische Farblösung geklärt werden. Da die Farbstoffe lichtempfindlich sind, wurde sofort photometriert und die Extinktion am Photometer Eppendorf (Filter Hg 546) gemessen.

Küvettenanordnung:

Äther	b
a	c

Eine Korrektur der Extinktion (z.B. nach ALLEN) erübrigte sich bei diesem Vorgehen (ZIMMERMANN et al., 1952). In dem gewählten Konzentrationsbereich waren die Logarithmen der Extinktionswerte proportional der Steroidkonzentration. An einer Androsteron-Eichkurve wurde der 17-Ketosteroidgehalt der Proben in Androsteron-Äquivalenten abgelesen und die Tagesausscheidung berechnet.

Die säulenchromatographische Trennung der 17-Ketosteroide

Die Säulenchromatographie von Steroiden wurde von CALLOW und DE LAAT (1939-41) als analytische Methode eingeführt. DINGEMANSE et al. (1946) wandten sie als Erste zur quantitativen Trennung von 17-Ketosteroiden an. Dabei werden die Steroide an ein Adsorptionsmittel, z.B. Aluminiumoxyd, Kieselsäuregel oder Cellulose je nach ihrer Pola-

rität verschieden stark adsorbiert. Die einzelnen Steroide oder Steroidgruppen werden durch entsprechende Lösungsmittel nacheinander aus der Säule eluiert. Sie werden in mehreren Fraktionen aufgefangen und getrennt bestimmt (Übersicht bei BUSH, 1961).

Das von JOHNSEN (1956) angegebene Verfahren erwies sich im Hormonlaboratorium der Abt. f. klin. Endokrinologie der I. Med. Univ. Klinik Frankfurt als zweckmäßig für die klinische Routineanalyse. Bei der eigenen Durchführung dieser Methode wurden zwei weitere Fraktionen eluiert.

a. Aufarbeitung des 24-Stunden-Harns:

400 ml des gut gemischten 24-Stunden-Sammelharns wurden zur Inaktivierung proteolytischer Fermente kurz aufgeköcht, mit Eisessig und Natriumacetat auf pH 4.5 eingestellt und mit 3000 FISHMAN-Einheiten β -Glucuronidase versetzt. Nach Zugabe von einigen ml Chloroform zur Hemmung des Bakterienwachstums wurde der Ansatz 14 Tage lang bei $37^{\circ} C$ inkubiert.

Die durch die fermentative Hydrolyse freigesetzten 17-Ketosteroide wurden im Cohen'schen Extraktor zwei Stunden lang mit Äther extrahiert, der Ätherextrakt im Scheidetrichter vom Harn abgetrennt. Es folgten Hydrolyse des extrahierten Harns (pH 4.5) 15 Minuten lang am Rückflußkühler bei $100^{\circ} C$, nach schneller Abkühlung die erneute Ätherextraktion im Cohen'schen Extraktionsapparat für 2 Stunden und die Abtrennung des Ätherextraktes im Scheidetrichter. Der Harn wurde nochmals, nunmehr bei einem pH von <1.5 , 20 Minuten lang

am Rückflußkühler hydrolysiert und anschließend wiederum im Cohen'schen Extraktor extrahiert. Die Ätherextrakte wurden vereinigt und im Wasserbad bei 40 - 50° C auf etwa 100 ml eingeeengt, von störenden Verschmutzungen und von phenolischen Steroiden durch dreimaliges Ausschütteln mit 10%-iger Natronlauge gereinigt, durch dreimaliges Waschen mit aqua dest. neutralisiert und bei 60° C zur Trockne gebracht. Wir bestimmten den 17-Ketosteroidgehalt des Rückstandes und verwandten einen aliquoten Teil (0.8 - 1.2 mg) zur Säulenchromatographie.

b. Säulenchromatographie:

Als Tubus für die Chromatographie verwandten wir ein etwa 100 cm langes Glasrohr mit einer lichten Weite von 11 mm. Es war am unteren Ende verjüngt und trug einen eingeschliffenen Glashahn zur Regulierung der Durchlaufgeschwindigkeit. Die Füllung der Säule und ihre Vorbereitung zur Chromatographie wurden nach den von LAKSHMANAN und LIEBERMAN (1954) für eine möglichst genaue Trennung als wichtig herausgestellten Punkten durchgeführt: Auf eine Lage Glaswolle ließen wir bei geschlossenem Hahn und benzolgefülltem Tubus 4.5 g Aluminiumoxyd - standardisiert nach BROCKMANN - sedimentieren. Auf das Aluminiumoxyd wurden eine kleine Menge gereinigten, säurefreien Seesandes und eine Lage Glasperlen geschichtet. Es erfolgte die Reinigung der Säule mit 200 ml Äthanol und 200 ml Äther. Der Wassergehalt des Aluminiumoxydes wurde durch den Feuchtigkeitsgehalt eines Luftstromes standardisiert, der vorher durch eine Gaswaschflasche mit 56%iger Schwefelsäure (D 1.48) geleitet worden war.

Das aus der Säule ausfließende Lösungsmittel wurde durch einen Überlaufsyphon in 7 ml-Fractionen aufgeteilt und in Reagenzgläsern getrennt aufgefangen. Die Durchlaufgeschwindigkeit wurde auf 2 - 3 Minuten eingestellt. Sie soll 3 ml/Minute nicht überschreiten, da bei einer zu hohen Durchlaufgeschwindigkeit die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Adsorption und Elution der Steroide nicht möglich ist. Nach der chromatographischen Trennung konnte die Säule nach Reinigung mit Äthanol und Äther und anschließender Einstellung des Feuchtigkeitsgehaltes wiederverwendet werden. Nach 10 bis 15 chromatographischen Trennungen wurde das Aluminiumoxyd erneuert.

Zu Beginn der Chromatographie wurde das Aluminiumoxyd mit Benzol angefeuchtet. Ein aliquoter Teil des gereinigten Steroidextraktes (0.8-1.2 mg) wurde zunächst in 3 ml Benzol gelöst und auf die Säule gebracht. Zweimaliges Nachspülen mit je 1 ml Benzol. Nach Adsorption der in Benzol gelösten Steroide an das Aluminiumoxyd erfolgte die Elution durch Benzol mit steigendem Äthanolgehalt. Es wurden nacheinander 5 ml einer 0.025, 0.05, 0.075, 0.10 %igen Lösung von Äthanol in Benzol vorsichtig überschichtet. Als erstes Hauptelutionsmittel wurden 200 ml Benzol mit 0.13 % Äthanolgehalt verwendet. Im Anschluß daran wurde mit 200 ml Benzol mit 0.5 % Äthanolgehalt eluiert, das ohne Fraktionierung durch einen Überlaufsyphon im Rundschliffkolben aufgefangen wurde. Die ersten zwei 7 ml-Fractionen der nachfolgenden Reinigung der Säule mit 200 ml Äthanol wurden gesondert aufgefangen. Sie enthielten die Restfraktion. Die gewonnenen Eluate wurden zur Trockne gebracht.

Nach Auflösung in Äthanol wurde der 17-Ketosteroidgehalt jeder Fraktion mit der ZIMMERMANN'schen Dinitrobenzolreaktion in Androsteron-Äquivalenten photometrisch bestimmt. Die Ausschaltung von störenden Chromogenen erfolgte durch die spezifische Ätherextraktion der ZIMMERMANN-Chromogene. Als Eichkurve diente eine mit Androsteron-Reinsubstanz aufgestellte Extinktionsgerade.

c. Identifikation der einzelnen Steroide:

Die Reihenfolge der Elution der verschiedenen 17-Ketosteroide bei der Adsorptionsschomatographie ist konstant. Ihre Zusammensetzung ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt (DINGEMANSE et al., 1946, 1952; BIRKE u. PLANTIN, 1954; JOHNSEN, 1956; ZIMMERMANN, STAIB u. PELZER, 1958).

Die Gipfel der eigenen Chromatogramme wurden papierchromatographisch und durch Fiehechromatogramme mit Reinsubstanzen in folgender Reihenfolge festgestellt: (1. Artefakte), 2. DHA und Isoandrostanolon, 3. Androsteron, 4. Ätiocholanolon, 5. 11-oxygenierte 17-Ketosteroide, (6. Restfraktion). Zur Kontrolle wurden Mischchromatogramme aus Harnextrakt und Reinsubstanz aufgestellt. Dabei zeigte sich die erwartete Erhöhung der entsprechenden Fraktion, ohne daß zusätzliche Gipfel als Zeichen einer Substanzverdrängung auftraten. Nach jeder neuen Füllung der Säule wurden Eichchromatogramme mit Reinsubstanzen angefertigt.

d. Reproduzierbarkeit:

Die Prüfung der Reproduzierbarkeit der Chromatogramme erfolgte durch Teilung von Extrakten und zweimaligen Lauf durch dieselbe und durch zwei verschiedene Säulen. Abstand und Reihenfolge der einzelnen Gipfel blieben bei konstanten Versuchsbedingungen gleich.

Zur Sicherung der Ergebnisse wurden von den meisten Untersuchungen (immer dann, wenn genügend Substanz zur Verfügung stand) Doppelbestimmungen durchgeführt.

e. Mengenberechnung der 17-Ketosteroidfraktionen:

Der Anteil der einzelnen chromatographischen Fraktionen an der Gesamtausscheidung der 17-Ketosteroide wurde in Prozent-Androsteron-Äquivalenten angegeben, ihre Größe in mg-Androsteron-Äquivalenten. Da die molare Extinktion der einzelnen Steroidfraktionen unterschiedlich ist, entsprechen die "mg-Androsteron-Äquivalente" nicht genau der wirklichen Ausscheidungshöhe, wie die gemessenen Extinktionen der betreffenden 17-Ketosteroide zeigen:

10 mg Androsteron-Äquivalent entsprechen

6.2 mg DHA (Umrechnungsfaktor 0.62)

10.4 mg Ätiocholanolon (Umrechnungsfaktor 1.04)

5.6 mg 11-Hydroxy-Ätiocholanolon (Umrechnungsfaktor 0.56)

Bei den folgenden Ergebnissen wurde zum Vergleich und zur genaueren Beurteilung die Absolutmenge jeder einzelnen Fraktion berechnet. Bei der Wertung der durchgeführten Untersuchungen erfolgen die Angaben üblicherweise in Prozent- und mg-Androsteron-Äquivalenten.

Statistische Berechnung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}$) und die mittlere quadratische Abweichung (Streuung) (s) berechnet.

Als Normalwertbereich (NW) wurde $\bar{x} \pm 2s$ bezeichnet.

Die statistische Beurteilung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit Hilfe der t-Verteilung nach STUDENT.

Abweichungen, deren Wahrscheinlichkeit $p < 0.05$ ist, wurden als signifikant und $p < 0.001$ als hochsignifikant betrachtet.

Extremwerte in den Stichproben wurden nach dem CHAUVENET'schen Kriterium ausgeschlossen (Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1955).

Ergebnisse

14 endokrin gesunde Frauen im Alter von 17 bis 46 Jahren wurden untersucht. Das Alter jeder einzelnen Patientin ist aus den Tabellen 1, 2 und 3 ersichtlich.

Die an den ein oder zwei Ruhetagen und am 1. und 2. ACTH-Belastungstag gesammelte Harnmenge betrug zwischen 400 und 2.200 ml. Zur Kontrolle der Vollständigkeit wurden die Kreatininausscheidung und das spezifische Gewicht gemessen; nur 24-Stunden-Sammelurine mit Kreatininnengen von mehr als 0.65 g wurden verarbeitet. Die gemessenen Einzelwerte finden sich in Tab. 1, 2 und 3.

Die Einzelwerte der 24-Stunden-Gesamtcorticoid-Ausscheidung finden sich ebenfalls in den drei ersten Tabellen.

Ihre Mittelwerte betrugen:

am Ruhetag	5.5 mg $\pm$ 1.7
am 1. ACTH-Tag	10.9 mg $\pm$ 3.0
am 2. ACTH-Tag	11.5 mg $\pm$ 3.5

Die statistische Berechnung dieser Werte ergab eine hochsignifikante ($p < 0.001$) Erhöhung der Gesamtcorticoid-Ausscheidung im Harn am 1. und am 2. ACTH-Belastungstag gegenüber dem Ruhetag. Zwischen dem 1. und dem 2. ACTH-Tag bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Einzelwerte der 24-Stunden-Ausscheidung der gesamten neutralen 17-Ketosteroide sind aus den Tabellen 1, 2 und 3 ersichtlich; die Mittelwertberechnung führte zu folgenden Ergebnissen:

am Ruhetag	11.3 mg	$\pm$ 4.0
am 1. ACTH-Tag	19.6 mg	$\pm$ 6.4
am 2. ACTH-Tag	22.9 mg	$\pm$ 6.0

Die Mittelwerte stiegen also am 1. ACTH-Belastungstag auf das 1.7-fache und am 2. ACTH-Belastungstag auf das 2.0-fache des Ruhewertes an.

Die Ausscheidung der 17-Ketosteroide war am Ruhetag von der am 1. und 2. ACTH-Belastungstag hochsignifikant ($p < 0.001$) verschieden. Der Unterschied zwischen dem 1. und dem 2. Belastungstag war nicht signifikant.

Die Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennung der gesamten neutralen 17-Ketosteroide sind als Prozentualwerte in den Tab. 4 bis 6, als Androsteronäquivalente in den Tab. 7 - 9 und als Absolutwerte in den Tab. 10 bis 12 dargestellt. Dabei wurden die Einzelwerte und die Androsteron/Ätiicholanolon-Quotienten ($A/\bar{A}$) der 14 untersuchten Frauen am Ruhetag, sowie am 1. und 2. ACTH-Belastungstag zur besseren Übersichtlichkeit in jeweils einer Tabelle zusammengefaßt.

Für das Verständnis erscheint es zweckmäßig, im folgenden die Mittelwerte nach Fraktionen geordnet mitzuteilen.

Dehydroepiandrosteron (DHA)

Der prozentuale Anteil der DHA-Fraktion an der 24-Stunden-Ausscheidung der 17-Ketosteroide betrug im Mittel:

am Ruhetag	13.1 %	$\pm$	2.8
am 1. ACTH-Tag	15.2 %	$\pm$	4.9
am 2. ACTH-Tag	15.1 %	$\pm$	6.4

Der prozentuale Anteil des DHA an der Gesamtausscheidung der 17-Ketosteroide am Ruhetag unterschied sich nicht signifikant von dem am 1. und 2. ACTH-Tag. Ebenfalls fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Belastungstagen.

In mg-Androsteron-Äquivalenten ausgedrückt war die DHA-Ausscheidung im Mittel:

am Ruhetag	1.6 mg	$\pm$	0.8
am 1. ACTH-Tag	2.8 mg	$\pm$	1.3
am 2. ACTH-Tag	3.3 mg	$\pm$	1.7

Diese Werte entsprechen folgenden Absolutmengen

am Ruhetag	0.97 mg	$\pm$	0.39
am 1. ACTH-Tag	1.89 mg	$\pm$	0.98
am 2. ACTH-Tag	1.97 mg	$\pm$	1.07

Die Androsteron-Äquivalente und ihnen entsprechend die ausgeschiedenen Absolutmengen an den beiden ACTH-Tagen unterschieden sich - im Gegensatz zu den oben dargestellten Prozentualwerten - signifikant ($p < 0.05$) von denen des Ruhetages; zwischen dem 1. und dem 2. ACTH-Belastungstag bestand dagegen kein signifikanter Unterschied dieser Größen.

Androsteron

Beim Androsteron betrug der prozentuale Anteil im Mittel:

am Ruhetag	22.0 %	$\pm$	3.4
am 1. ACTH-Tag	22.6 %	$\pm$	5.0
am 2. ACTH-Tag	21.4 %	$\pm$	3.9

Beim Vergleich des prozentualen Anteils des Androsteron am Ruhetag mit dem an den beiden Belastungstagen fand sich kein signifikanter Unterschied der Ausscheidung; auch die Werte der beiden ACTH-Belastungstage waren nicht signifikant unterschieden.

Die Berechnung der absoluten 24-Stunden-Ausscheidung von Androsteron ergab einen Mittelwert von:

am Ruhetag	2.67 mg	$\pm$	1.33
am 1. ACTH-Tag	4.06 mg	$\pm$	1.64
am 2. ACTH-Tag	4.60 mg	$\pm$	1.10

Der Unterschied der Androsteronausscheidung war zwischen dem Ruhetag und dem 1. ACTH-Belastungstag signifikant ($p < 0.05$), zwischen dem Ruhetag und dem 2. ACTH-Belastungstag hochsignifikant ($p < 0.001$) und zwischen dem 1. und 2. Belastungstag nicht signifikant.

Ätiocholanolon

Die Ätiocholanolonausscheidung in Prozent betrug im Mittel:

am Ruhetag	20.9 %	$\pm$	5.9
am 1. ACTH-Tag	22.0 %	$\pm$	6.8
am 2. ACTH-Tag	19.6 %	$\pm$	6.2

Der prozentuale Ätiocholanolonanteil am Ruhetag und an den beiden Belastungstagen war nicht signifikant verschieden.

In mg Androsteron-Äquivalenten waren die Mittelwerte für Ätiocholanolon:

am Ruhetag	2.6 mg	$\pm$	1.6
am 1. ACTH-Tag	4.6 mg	$\pm$	2.1
am 2. ACTH-Tag	4.5 mg	$\pm$	1.8

Sie entsprechen folgenden Absolutmengen in Ätiocholanolon:

am Ruhetag	2.72 mg	$\pm$	1.65
am 1. ACTH-Tag	4.79 mg	$\pm$	2.23
am 2. ACTH-Tag	4.76 mg	$\pm$	1.93

Bei der Berechnung der Androsteron-Äquivalente und der Absolutmengen ergab sich zwischen der Ausscheidung des Ruhetages und der des 1. und 2. ACTH-Belastungstages ein signifikanter ($p < 0.05$) Unterschied. Ein solcher Unterschied zwischen den beiden Belastungstagen bestand auch hier nicht.

11-oxygenierte 17-Ketosteroide

Der prozentuale Anteil der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide betrug im Mittel:

am Ruhetag	20.3 %	$\pm$	3.5
am 1. ACTH-Tag	20.9 %	$\pm$	5.2
am 2. ACTH-Tag	23.8 %	$\pm$	5.2

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei untersuchten Tagen.

Als mg Androsteron-Äquivalente ausgedrückt ergaben sich die Mittelwerte:

am Ruhetag	2.4 mg	$\pm$	0.9
am 1. ACTH-Tag	4.3 mg	$\pm$	1.6
am 2. ACTH-Tag	5.7 mg	$\pm$	1.7

Diese Werte entsprechen einer Absolutausscheidung von folgenden Mittelwerten:

am Ruhetag	1.37 mg	$\pm$	0.53
am 1. ACTH-Tag	2.39 mg	$\pm$	0.91
am 2. ACTH-Tag	3.17 mg	$\pm$	0.95

Statistische Unterschiede zwischen den ermittelten Androsteron-Äquivalenten und ihnen entsprechend den errechneten Absolutmengen ergaben sich bei den 11-oxygenierten 17-Ketosteroiden für alle drei untersuchten Tage: Zwischen dem Ruhetag und dem 1. ACTH-Belastungstag war er signifikant ($p < 0.05$); zwischen dem Ruhetag und dem 2. ACTH-Tag war er hochsignifikant ($p < 0.001$); auch zwischen dem 1. und dem 2. ACTH-Belastungstag bestand ein signifikanter ($p < 0.05$) Unterschied.

Die bisher aufgeführten Ergebnisse sind in einer Übersicht auf Tab. 13 zusammenfassend dargestellt. Es zeigt sich, daß bei keiner der vier Fraktionen DHA, Androsteron, Ätiocholanolon, 11-oxygenierte 17-Ketosteroide der Mittelwert des prozentualen Anteils der einzelnen Fraktionen an der Gesamtmenge ausgeschiedener 17-Ketosteroide nach ACTH-Belastung signifikant ansteigt, weder am 1. noch am 2. ACTH-Belastungstag.

Die Mittelwerte der mg-Androsteron-Äquivalente und ebenso die daraus errechneten Absolutmengen der genannten Fraktionen steigen signifikant bzw. hochsignifikant unter der ACTH-Belastung an. Diese Anstiege liegen in derselben Größenordnung wie der Anstieg der gesamten 17-Ketosteroide. (Siehe auch Tab. 13).

Die Mittelwerte der Androsteron/Ätiocholanolon-Quotienten, die im Einzelnen aus den Tab. 4 bis 12 ersichtlich sind, sind ebenfalls in der Tab. 13 mit den genannten Fraktionen zusammengestellt. Die Androsteron- und Ätiocholanolonfraktion verhalten sich im Mittel etwa wie 1:1. Dieses Verhältnis gilt am Ruhetag und an den beiden ACTH-Tagen, sowohl bei prozentualer Verteilung wie auch nach Berechnung von Androsteron-Äquivalenten und Absolutmengen. Unter ACTH-Belastung kommt es also nicht zur Verschiebung der relativen Ausscheidung dieser beiden 17-Ketosteroidfraktionen.

Außer den vier besprochenen und klinisch-diagnostisch wichtigen 17-Ketosteroid-Fraktionen fielen bei der Säulenchromatographie in den ersten Eluatportionen Artefakte und in den letzten die sog. Restfraktion mit einem in den Tab. 4-6 ange-

gegebenen prozentualen Anteil an. Es handelt sich bei den Ersteren um Hydrolyseartefakte und nicht identifizierte Steroide und bei den Letzteren im Wesentlichen um mehrfach oxygenierte Pregnanverbindungen. Sie können bei der gegebenen Fragestellung vernachlässigt werden und wurden deshalb nicht auf Androsteron-Äquivalente bezogen, und es wurden keine Absolutmengen errechnet.

Diskussion

In der folgenden Diskussion sollen zur besseren Übersicht Methoden und Ergebnisse nacheinander besprochen werden.

Die Ausscheidung der Corticosteroide und der 17-Ketosteroide wird von zahlreichen extraadrenalen Faktoren mehr oder weniger stark beeinflusst, z.B. von Geschlecht, Alter, Konstitution, tages- und jahreszeitlichen Schwankungen, Witterungsverhältnissen, psychischen und physischen Stress-Situationen, akuten und chronischen Krankheiten (HAMBURGER, 1948; BIRKE u. PLANTIN, 1954; ZIMMERMANN, 1955a; VOIGT et al., 1955; DORFMAN u. SHIPLEY, 1956; BORTH et al., 1957; HERETH, 1960; SCHÄFER, 1961; TABEL, 1963; SCHTEINGART et al., 1963; KAISER et al., 1964; LEHNERT et al., 1965). Bei der Beurteilung von Ergebnissen von Hormonbestimmungen müssen deshalb diese Einflüsse berücksichtigt werden.

Unsere Untersuchungen wurden während eines stationären Aufenthaltes der Frauen durchgeführt. Diese waren in geschlechtsreifem Alter (17 - 46 Jahre) und litten nicht an endokrinen Erkrankungen oder an akuten oder schweren chronischen Krankheiten anderer Organe.

Die Tagesrhythmik der Steroidausscheidung im Harn, die Abreise und etwaige Unzuverlässigkeiten der Patientinnen und des Stationspersonals wurden in folgender Weise berücksichtigt: Bei allen Bestimmungen wurde aus einem aliquoten Teil eines 24-Stunden-Sammelharns die Tagesausscheidung berechnet. Wichtig war dabei die Kontrolle des

spezifischen Gewichts und der Kreatininausscheidung, weil die Unvollständigkeit des Sammelharns sich bei uns als die häufigste und größte Fehlerquelle herausstellte (siehe auch STAIB, 1962). So konnten wir bei einer Patientin (Verdacht auf Cushing-Syndrom) nach mehreren diagnostisch irre-führenden Befunden nur durch Dauerkatheterisierung verwertbare Ergebnisse erhalten. Diese Erfahrungen ließen uns besonderen Wert darauf legen, keine Messungen an Sammelurinen vorzunehmen, die nicht eine Kreatininausscheidung von mindestens 0.65 g/24 Std. hatten; in der Mehrzahl der Fälle lag sie über 1.0 g/24 Std.

Unter den oben genannten Bedingungen kamen wir bei Wiederholungen von 17-Ketosteroidbestimmungen aus dem 24-Stunden-Harn an Ruhetagen zu nahe beieinanderliegenden Werten. Deshalb wurde wie bei den Routineuntersuchungen der 17-Ketosteroidausscheidung auch bei den eigenen Hauptversuchen auf die Untersuchung eines zweiten Ruhetages weitgehend verzichtet, da sich die beiden ACTH-Belastungstage zeitlich unmittelbar an den Ruhetag anschlossen. Dabei ist zu betonen, daß eine solche gute Übereinstimmung nur dann mit hoher Wahrscheinlichkeit erwartet werden darf, wenn die Untersuchungen an aufeinanderfolgenden Tagen vorgenommen werden.

Der zweitägige ACTH-Belastungstest mit je 25 IE wasserlöslichem ACTH (RENOLD et al., 1952; JENKINS et al., 1955) ist das beste Verfahren, um eine maximale Stimulierung der NNR zu erreichen (PFEIFFER, 1961). Unzuverlässige Ergebnisse, wie sie z.B. durch Resorptionsstörungen bei intramuskulärer Applikation von ACTH-Gel-Präparaten

auftreten können (WEISSBECKER, 1955; PRUNTY, 1956), werden vermieden. Unverträglichkeitserscheinungen traten bei unseren Probanden nicht auf.

Jede Art der Hydrolyse vor der Fraktionierung der 17-Ketosteroide ist heute noch ein Kompromiss zwischen unvollständiger Freisetzung und Destruktion von Steroiden. Die Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennung sind daher weitgehend von der vorausgegangenen Aufarbeitung des Harns abhängig.

Durch Solvolyse (BURSTEIN u. LIEBERMAN, 1958) werden nur Sulfate gespalten. Eine enzymatische Hydrolyse mit β -Glucuronidase setzt nur etwa 50 % der Steroidkonjugate frei (BIRKE u. PLANTIN, 1954; DORFMAN, 1956), zusätzliche Anwendung von Sulfatase nur 60 - 70 % (KUHN u. STAUDINGER, 1960). Bei heißer Hydrolyse mit Salzsäure (pH 0.5-0.5) treten eine Reihe von chemischen Veränderungen am Steroidmolekül auf. Umlagerungen und Verluste verschiedenen Ausmaßes wurden besonders beim DHA beschrieben (LIEBERMAN et al., 1952; DORFMAN u. SHIPLEY, 1956; JOHNSON, 1956; STAIB u. SCHILD, 1958b; POND, 1951). 11-oxygenierte 17-Ketosteroide werden dehydriert und erscheinen in der Androsteron- bzw. Ätiocholanolonfraktion (DINGEMANSE et al., 1952; LIEBERMAN et al., 1952; BIRKE u. PLANTIN, 1954; DORFMAN u. SHIPLEY, 1956; VOIGT et al., 1960).

Beim Vergleich verschiedener Hydrolyseverfahren stellten STAIB und SCHILD (1958b) fest, daß eine fraktionierte Hydrolyse, z.B. nach LIEBERMAN, MOND u. SMYLES oder wie sie im methodischen Teil beschrieben wurde, die wirksamste und schonendste Freisetzung der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide bewirkt. So fanden nach heißer Säurehydrolyse

BIRKE u. PLANTIN 10 - 15 %, POND 9 %, STAIB und SCHILD 8.9 % und v. ZERSSSEN 8.7 % 11-oxygenierte 17-Ketosteroide, während nach fraktionierter Hydrolyse (d.h. enzymatischer und anschließender schonender Säurehydrolyse) der Anteil dieser Fraktion an der 24-Stunden-Ausscheidung etwa 20 % beträgt (STAIB u. SCHILD 1958b; KUHN u. STAUDINGER, 1960; SCHÖFFLING et'al., 1961). Mit diesen letzten Angaben stimmt auch der mit dieser Hydrolyse gewonnene eigene Mittelwert von 20.3 % überein.

Der Wert der fraktionierten Hydrolyse zeigt sich auch beim DHA, das vorwiegend als Sulfat ausgeschieden wird, besonders deutlich. Es wird, wie bereits erwähnt, durch die heiße Säurehydrolyse bei pH 0.3-0.5 weitgehend zerstört oder verändert, kann jedoch durch eine Schwefelsäure-Hydrolyse bei pH 4.5 schonend freigesetzt werden. Dabei tritt im Wesentlichen nur eine Umlagerung in Isoandrostanolon ein, das sich säulenchromatographisch sehr ähnlich wie DHA verhält (DINGEMANSE, 1952; TRICH et al., 1953; LIEBERMAN et al., 1954; STAIB u. SCHILD, 1958b). Bei den eigenen säulenchromatographischen Untersuchungen waren damit verlässliche Ergebnisse für die DHA-Fraktion zu erwarten.

Zusammenfassend kann über die fraktionierte Hydrolyse festgestellt werden, daß sie trotz des erheblichen Aufwandes an Zeit und Arbeit als besonders geeignetes Verfahren zur Aufarbeitung der 17-Ketosteroide für die chromatographische Trennung angesehen werden muß. Sie wurde deshalb anderen Methoden vorgezogen.

Mittlerweile ist ein weiteres chemisches Hydrolyseverfahren entwickelt worden, mit dem die Glucuronide und Sulfate der Harn-17-Ketosteroide durch Perchlorsäure in Tetrahydrofuran oder Ethylacetat mit verschiedenen Wasserkonzentrationen schonend freigesetzt werden (JACOBSON u. LIEBERMAN, 1962; DE PAOLI et al., 1963).

Die säulenchromatographische Trennung der 17-Ketosteroide wurde nach einer Modifikation der Methode von JOHNSON (1956) durchgeführt. Dieses Verfahren ist für klinische Routine-Analysen bei einem größeren Untersuchungsgut besonders geeignet. Es arbeitet zuverlässig und schnell mit hinreichender Genauigkeit, kleinen Substanzmengen und vergleichsweise niedriger Fraktionenzahl. Außerdem kann die Aluminiumoxydsäule regeneriert und für mehrere Analysen nacheinander verwendet werden.

Während JOHNSON nur Artefakte, B-Steroide, Androsteron und Ätiocholanolon aus der Säule eluiert und die 11-oxygenierten 17-Ketosteroide zusammen mit der Restfraktion rechnerisch ermittelt, trennen ZIMMERMANN, STAIB und PELZER (1958) auch die 11-oxygenierten 17-Ketosteroide säulenchromatographisch. Die dann noch auf der Säule verbliebenen ZIMMERMANN-positiven Steroide errechnen sie als sog. Restfraktion. Es handelt sich dabei vorwiegend um mehrfach oxygenierte Pregnanverbindungen. Unsere Modifikation bestand im Wesentlichen darin, die Restfraktion nicht zu errechnen, sondern ebenfalls zu eluieren, und zwar mit reinem Äthanol. Weitere Eluate waren ZIMMERMANN-negativ.

Bei streng gleichbleibenden Versuchsbedingungen und sorgfältiger Arbeitsweise setzen sich die einzelnen Steroidgruppen im Chromatogramm gut voneinander ab. Die Verteilung auf die einzelnen Fraktionsnummern zeigt dabei nur ganz geringe Schwankungen. Deshalb ist das unfraktionierte Auffangen der Gruppe der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide möglich. Das bedeutet eine Arbeitersparnis, ohne daß die für klinische Untersuchungen zu fordernde Genauigkeit leidet. Eine weitere Vereinfachung der Methode durch Verzicht auf die Aufteilung in kleine Fraktionsportionen in der Androsteron- und Ätiocholanolongruppe ist jedoch nicht möglich, wenn man nicht auf eine exakte Auftrennung von Androsteron und Ätiocholanolon und die Beurteilung des Androsteron/Ätiocholanolonquotienten verzichten will.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden und Modifikationen zur Isolierung und Messung der NNR-Hormone bzw. ihrer Stoffwechselprodukte im Harn. Diese Methoden wurden, soweit sie im Zusammenhang mit der eigenen Versuchsanordnung stehen, kurz erörtert. Leider muß man aber zu dem Ergebnis kommen, daß Vergleichsgrundlagen nur in begrenztem Maße und bedingt gegeben sind. Andererseits begründet diese Tatsache die vorliegenden Untersuchungen, bei denen der Wert der eigenen Verfahren ermittelt und dargestellt werden sollte.

Die 14 Probanden, deren 17-Ketosteroide chromatographisch getrennt wurden, entstammen einem Kollektiv von 50 Frauen, bei denen im gleichen Zeitraum ACTH-Belastungsproben durchgeführt wurden. Ihre Mittelwerte für die 24-Stunden-Ausscheidungen der Gesamtcorticoide und der 17-Ketosteroide in Ruhe und unter ACTH-Belastung stimmen überein. Die dabei ermittelten Werte für die Gesamtcorticoide, wie sie in Tab. 1, 2, 3 wiedergegeben wurden, lassen sich aus den erwähnten methodischen Gründen kaum mit Ergebnissen anderer Autoren vergleichen. Die zahlreichen Möglichkeiten der Corticoidbestimmung erfassen jeweils andere labile Molekülgruppierungen; die mehr oder weniger spezifischen Gruppenreaktionen führen zu unterschiedlichen Normalwerten (ZIMMERMANN, 1955a, RAFTOPOULO et al., 1959; STAIB, 1962; TAMM, 1963). Die wenigen vergleichbaren Befunde, die uns zugänglich waren, sind in Tab. 14 zusammengestellt. Die eigenen Mittelwerte und die Streuung passen sich gut ein; es ergibt sich, daß es sich bei den untersuchten eigenen Probanden um Fälle mit Normalausscheidung gehandelt hat.

Bei den Messungen der 17-Ketosteroid -Ausscheidung liegen günstigere Vergleichsmöglichkeiten vor als bei den Gesamtcorticoiden. Wie schon besprochen wurde, leiten sich praktisch alle Untersuchungsmethoden von der ZIMMERMANN'schen Dinitrobenzolreaktion (1935) ab. Aus einer Vielzahl von Literaturangaben über die 17-Ketosteroidausscheidung gesunder, geschlechtsreifer Frauen wurden in der Tab. 15 die Ruhewerte und in Tab. 16 die Werte nach ACTH-Belastung zusammengefaßt und den eigenen gegenüber-

gestellt. Die Anzahl der von den verschiedenen Autoren untersuchten Normalfälle ist sehr unterschiedlich. Die Höhe der Mittelwerte wird durch die einzelnen Modifikationen der ZIMMER-MANN-Reaktion beeinflusst. Bei zahlreichen Ruhewerten (Tab. 15) fällt die Größe der Schwankungsbreite auf; z.B. geben DORFMAN et al. 4.0 - 22.0 mg/24 Std. an. Die eigenen Zahlen (11.3 ± 4.0 mg/24 Std.) dürfen bei diesem Vergleich als durchaus befriedigend angesehen werden. Dasselbe gilt für die Ergebnisse nach ACTH-Belastung (siehe Tab. 16). Hier stimmen die Vergleichswerte anderer Untersucher mit den eigenen überein. Es darf also auch aus den Ergebnissen der 17-Ketosteroid-Bestimmung sowohl in Ruhe wie unter ACTH-Belastung geschlossen werden, daß die von uns untersuchten Frauen Normalwerte aufwiesen.

Die soeben besprochenen Befunde für die Gesamtcorticoid- und 17-Ketosteroid-Ausscheidung im Harn in Ruhe und unter ACTH-Belastung haben gezeigt, daß die 14 untersuchten Frauen ein geeignetes Material boten, um auch säulenchromatographisch Normalwerte einzelner Fraktionen zu ermitteln.

Die bei dieser Auftrennung gefundenen Ergebnisse sind in den Tab. 4-12 dargestellt und in Tab. 13 zusammengefaßt. Vergleicht man die Werte am Ruhetag mit denen anderer Untersucher (Tab. 17-19), so fallen als erstes erhebliche Unterschiede in der Anzahl und Aufteilung der

Fraktionen bei den verschiedenen Autoren auf. Je nach Methode und je nachdem, ob aus mehr theoretischen Gründen eine möglichst große Zahl von Steroiden isoliert und identifiziert werden soll oder ob die Fragestellung mehr eine klinisch-diagnostische ist, werden mehr oder weniger Einzelfraktionen eluiert bzw. zu Fraktionsgruppen zusammengefaßt. Diese Tatsache erschwert den Vergleich der absoluten und relativen Verteilung der vier klinisch-diagnostisch wichtigen Fraktionen DHA, Androsteron, Ätiocholanolon und 11-oxygenierte 17-Ketosteroide.

Für das DHA geben BIRKE und PLANTIN den niedrigsten (6.9 %) und POND den höchsten (20 %) Prozent-Wert an. Die eigene Zahl liegt mit 13.1 % dazwischen. Die Unterschiede dürften zum Teil durch die Art der vorausgegangenen Hydrolyse beeinflusst sein; wie schon ausgeführt wurde, entstehen aus dem DHA umso weniger Artefakte je schonender diese ist. Soweit Angaben über die ausgeschiedenen Absolutmengen (mg/24 Std.) vorliegen, stimmen die der anderen Untersucher gut mit den eigenen (1.6 ± 0.8 mg) überein.

Beim Androsteron (siehe Tab. 17-19) liegen unsere Mittelwerte von 22 %, entsprechend 2.7 ± 1.3 mg nahe denen von JOINSEN, KELLER u. HAUSER, STAIB u. SCHILD, HUSSLEIN u. SCHÜLLER und v. ZERSSSEN et al.. Andere Autoren, wie BIRKE u. PLANTIN, POND, KARL geben höhere Zahlen an. Zu diesen Unterschieden ist zu sagen, daß unser Hydrolyseverfahren zu den schonenden gehört, wie oben erörtert wurde; die bei weniger schonender Hydrolyse durch Dehydrierung entstandenen Artefakte der 11-oxygenierten 17-Keto-

steroide erscheinen chromatographisch in der Androsteron- bzw. Ätiocholanolon-Fraktion. Unsere Androsteron- und mehr noch die Ätiocholanolon-Fraktion sind also wahrscheinlich gegenüber denen der zuletzt genannten Autoren arm an Hydrolyse-Artefakten der 11-oxygenierten 17-Ketosteroiden.

Unser prozentualer Mittelwert für Ätiocholanolon von 20.9 % ist niedriger als der der meisten in den Tab. 17-19 zum Vergleich herangezogenen Untersucher. Allerdings ist bei dieser Fraktion die Streuung größer als bei den anderen Fraktionen. Soweit Androsteron-Äquivalente (mg/24Std) angegeben sind, stimmen diese dagegen mit den eigenen ($2.6 \text{ mg} \pm 1.6$) weitgehend überein (z.B. JOHNSEN, v. ZERSSSEN et al.). Diese Übereinstimmung ist eine nur scheinbare, wenn der Normalwert für die Gesamt-17-Ketosteroid-Ausscheidung bei den einzelnen Autoren unterschiedlich hoch liegt (siehe Tab. 14). Die niedrigen Gesamt-17-Ketosteroid-Werte von JOHNSEN und von v. ZERSSSEN et al. führen bei einem höheren Prozentsatz dieser Fraktion zu etwa gleichem Absolutwert. - Diese hier beim Ätiocholanolon angestellte Überlegung gilt entsprechend auch bei den anderen chromatographischen Fraktionen.

Bei den 11-oxygenierten 17-Ketosteroiden sind unsere im Vergleich zu einer Reihe der anderen Untersucher (BIRKE u. PLANTIN, POND, KARL, v. ZERSSSEN et al.) hohen Mittelwerte (20.3 %, $2.4 \text{ mg} \pm 0.9$) auffällig. Mit den Angaben von KELLER u. HAUSER und STAIB u. SCHILD stimmen sie dagegen gut überein. Bei der Besprechung der verschiedenen Hydrolyseverfahren wurde bereits

eine Erklärung für diese Unterschiede gegeben: Je schonender die Hydrolyse ist, umso geringer ist der Anteil der durch Dehydrierung entstehenden Artefakte, die mit dem Androsteron bzw. Ätiocholanolon erscheinen, und umso höher ist also die Fraktion der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide. Es darf deshalb hier nochmals bemerkt werden, daß die mit unserer Methode gewonnene prozentuale Verteilung der klinisch-diagnostisch wichtigen Fraktionen der 17-Ketosteroide als recht befriedigend angesehen werden kann.

Dem Androsteron/Ätiocholanolon-Quotienten wurde vor allem deshalb immer wieder klinische Bedeutung beigemessen, weil bei einigen Funktionsstörungen der NNR eine Verschiebung zugunsten der einen oder der anderen der beiden Fraktionen beobachtet wurde, und weil von einer Reihe von Untersuchern bei Patientinnen mit sog. idiopathischem Hirsutismus trotz teilweise normaler Gesamt-17-Ketosteroid-Ausscheidung eine Erhöhung der Androsteron-Fraktion gefunden wurde (POND, 1954; ZIMMERMANN u. LINS, 1959; v. ZERSEN, 1960).

Die Ermittlung des Quotienten basiert vor allem auf zwei methodischen Voraussetzungen: Die eine besteht in der Darstellung der einzelnen Fraktionen durch schonende Aufbereitung des Harns, die andere beruht auf einer befriedigenden chromatographischen Trennung dieser Fraktionen. Die Säulenchromatographie mit der modifizierten Methode nach JOHNSON erlaubt eine gute Auftrennung.

Beim Vergleich der Größe des Androsteron/Ätiocholanolon-Quotienten (Tab. 17-19) zeigen sich Unterschiede zwischen den Angaben der verschiedenen Autoren. Der niedrigste Wert wird von STAIB u. SCHILD mit 0.66 angegeben. Die meisten Autoren (POND, JOHNSEN, v. ZERSEN et al.) liegen mit ihren Quotienten ebenso wie wir selbst um 1. KUHN u. STAUDINGER (1960) fanden dagegen nur bei Säurehydrolyse einen A/Ä-Quotienten von 1, nach fraktionierter Hydrolyse aber von 2.

Sowohl bei uns als auch bei anderen Untersuchern ist allerdings der Normalwertbereich des A/Ä-Quotienten groß (siehe Tab. 4-12 u. 17-19). Diese breite Streuung der Normalwerte, auch bei Anwendung von ein und derselben und an sich befriedigend erscheinenden Methode, schränkt die Bedeutung des A/Ä-Quotienten ein. Je größer die Streuung, umso schwieriger wird die Beurteilung von Grenzfällen (s. auch GOLDZIEHER u. AXELROD, 1962; MAHESH et al., 1964). Daher wurde vor allem in letzter Zeit häufig auf die Ermittlung des Quotienten, teilweise auch auf die getrennte Darstellung der Androsteron- und Ätiocholanolon-Fraktion, verzichtet.

Unter der Belastung mit 2 mal 25 IE ACTH (i.v.) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen stiegen die Mittelwerte aller 17-Ketosteroid-Fractionen signifikant bzw. hochsignifikant an, wie die auf Seite 24-28 und in den Tab. 3-12 und 13 und in Abb. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen. Es stellt sich hier die Frage, wieweit sich unter dieser Belastung bei den untersuchten endokrin gesunden

Frauen im geschlechtsreifen Alter der prozentuale Anteil der einzelnen 17-Ketosteroid-Fractionen in signifikantem Ausmaß ändert oder nicht. Die Antwort ist graphisch in Abb. 2 dargestellt; man kann daraus ersehen, daß der Mittelwert keiner der vier Fraktionen DHA, Androsteron, Ätiocholanolon und 11-oxygenierte 17-Ketosteroide eine signifikante Änderung aufweist, weder vom Ruhetag zum 1. ACTH-Tag, noch vom 1. zum 2. Belastungstag. Zwar zeigt der prozentuale Mittelwert der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide im Gegensatz zu den anderen Fraktionen am 2. ACTH-Tag einen Anstieg gegenüber dem 1. ACTH-Tag, aber auch hier besteht kein statistischer Unterschied.

Es ergibt sich damit, daß die Mittelwerte der untersuchten Fraktionen der 17-Ketosteroide unter Belastung mit zwei mal 25 IE ACTH an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in etwa gleichem Verhältnis ansteigen. Diese Tatsache spiegelt sich außerdem darin, daß der Mittelwert des Androsteron/Ätiocholanolon-Quotienten praktisch konstant blieb (siehe Zusammenfassung der Werte in Tab. 13).

Ein Vergleich der Absolutwerte, die bei den eigenen und bei den Untersuchungen anderer Autoren gefunden wurden, ist hier aus mehreren Gründen besonders schwierig: Die angegebenen Ausgangswerte sind unterschiedlich. Sowohl die ACTH-Belastung, wie auch die Hydrolyse, Trennung und Darstellung der 17-Ketosteroid-Fractionen wurde mit verschiedenen Methoden vorgenommen. Außerdem spielt für die Wertigkeit der bei den

verschiedenen Untersuchungen errechneten Mittelwerte die Zahl der Fälle eine nicht unerhebliche Rolle: Einige Autoren untersuchten nur 2, andere mehr, wir 14 Normalfälle.

Bei der vergleichenden Betrachtung der relativen Veränderung der 17-Ketosteroid-Fraktionen unter ACTH-Belastung ergibt sich folgendes: Alle Autoren beschreiben einen Anstieg sämtlicher Fraktionen. Allerdings werden die Verhältnisswerte der Einzelfraktionen zueinander verschiedenen angegeben. KELLER u. HAUSER (1958) und LAN-THIER (1960) fanden einen relativ höheren Anstieg der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide. PAABY (1956) beschrieb eine relativ erhöhte DHA-Fraktion, sowohl unter ACTH als auch unter postoperativem Stress. Bei den von KAPPAS u. GALLAGHER (1955) und von HALMAN u. MARTIN (1964) untersuchten Frauen war der Anstieg von DHA proportional am größten; die 11-oxygenierten 17-Ketosteroide stiegen prozentual stärker als die Androsteron- und Ätiocholanolon-Fraktion. Das Verhältnis von Androsteron zu Ätiocholanolon blieb praktisch gleich. JEFFERIES u. MICHELAKIS (1963) fanden sowohl gleichmäßige als auch verschieden hohe Anstiege der einzelnen Fraktionen unter ACTH-Belastung. BIRKE und PLANTIN (1953) beobachteten einen gleichmäßigen Anstieg aller geprüften Fraktionen. Die mit den zuletzt genannten Autoren übereinstimmenden eigenen Ergebnisse stammen von einer größeren Anzahl von Fällen als bei den meisten anderen Autoren. Dabei darf darauf hingewiesen werden, daß der Repräsentativwert errechneter Mittelwerte wie auch der Streuung mit steigender Fallzahl zunimmt.

Aus unseren Ergebnissen bei der säulenchromatographischen Trennung der 17-Ketosteroide ist also zu schließen, daß eine Fraktionierung unter ACTH-Belastung bei endokrin gesunden geschlechtsreifen Frauen gegenüber den Ruhewerten keine zusätzlichen Aufschlüsse bringt. Das an den vorgenommenen Messungen gezeigte Verhalten, auch unter zweitägiger ACTH-Belastung, darf als eine hinreichend klare Vergleichsgrundlage zur Erkennung abnormer Funktionszustände der NNR angesehen werden. Signifikante Änderungen der prozentualen Verteilung der Fraktionen unter ACTH müssen demnach als Zeichen einer NNR-Funktionsstörung betrachtet werden.

Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode der säulenchromatographischen Fraktionierung der 17-Ketosteroide auf ihre Eignung im klinischen Hormonlaboratorium zu untersuchen und die Normalwerte des Verfahrens zu ermitteln.

Einleitend wurde ein kurzer Überblick über Synthese, Metabolismus und Steuerung der Produktion von NNR-Hormonen gegeben.

Folgende Verfahren wurden in der eigenen Untersuchung angewendet: 1. Zur Bestimmung der Gesamtcorticoide eine Modifikation der Methode von STAUDINGER u. SCHMEISSER; 2. für die Messung der 17-Ketosteroide die ZIMMERMANNsche Dinitrobenzolreaktion; 3. für die säulenchromatographische Fraktionierung der 17-Ketosteroide eine eigene Modifikation der Methode von JOHNSEN. Die dabei eluierten Fraktionen waren Artefakte, DHA, Androsteron, Ätiocholanolon, 11-oxygenierte 17-Ketosteroide und Restfraktion. Aus den photometrisch ermittelten Werten wurden ihre prozentuale Verteilung, ihre mg-Androsteron-Äquivalente, ihre Absolutmengen und der Androsteron/Ätiocholanolon-Quotient errechnet. Die Auftrennung der Fraktionen war gut. Die Bedeutung einer fraktionierten Hydrolyse vor der chromatographischen Auftrennung, das säulenchromatographische Verfahren und die Zweckmäßigkeit, zusätzlich zu den von JOHNSEN gewonnenen Fraktionen zwei weitere zu eluieren, wurden hervorgehoben.

Mit den dargestellten Methoden wurden bei 14 endokrin gesunden Frauen im Alter von 17 - 46 Jahren die 24-Stunden-Ausscheidung der Gesamtcorticoide und der 17-Ketosteroide bestimmt sowie die chromatographische Fraktionierung der 17-Ketosteroide durchgeführt. Dabei wurden die Ruheausscheidung und an den beiden folgenden Tagen die Ausscheidung unter Belastung mit je 25 IE ACTH im 24-Std.-Sammelharn gemessen.

Aus den Untersuchungen ergab sich ein signifikanter Anstieg der 17-Ketosteroid-Ausscheidung bereits am 1. und ein weiterer Anstieg am 2. ACTH-Tag. Die Fraktionen zeigten unter ACTH-Belastung keine signifikante Änderung gegenüber der prozentualen Verteilung am Ruhetag. Der A/Ä-Quotient blieb konstant. Unsere Resultate wurden den Ergebnissen anderer Autoren gegenübergestellt.

Aus den vorliegenden Untersuchungen wurden drei Folgerungen gezogen: 1. Die angewandte Methode erlaubt eine gute Trennung der Fraktionen und ist im klinisch-diagnostischen Betrieb einsetzbar. 2. Die säulenchromatographische Fraktionierung der 17-Ketosteroide unter ACTH-Belastung bringt bei der gesunden geschlechtsreifen Frau gegenüber dem Chromatogramm des Ruhetages keine zusätzlichen Aufschlüsse. 3. Signifikante Änderungen der prozentualen Verteilung von DHA, Androsteron, Ätiocholanolon und 11-oxygenierten 17-Ketosteroiden unter zweitägiger ACTH-Belastung sind somit Zeichen einer gestörten NNR-Funktion.

Tab. 1

24-Stunden-Gesamtcorticoid- und 17-Ketosteroid-
ausscheidung endokrin gesunder Frauen

Nr.	Name	Alter in Jahren	Harn- menge ml	<u>Ruhetag</u>		
				Krea- tinin g	Gesamtcor- ticoide mg	17-Keto- steroid- mg
1	W.Di.	40	1200	1.43	7.2	18.4
2	M.Ha.	23	600	0.65	4.9	10.0
			600	0.83	6.1	11.0
3	H.Ke.	17	1100	0.97		7.3
			1100	1.20	6.5	7.5
4	R.Na.	25	450	1.20	4.3	19.1
5	H.No.	44	1650	0.65	4.6	9.5
			1000	0.98	3.0	7.2
6	H.Or.	37	750	0.87	4.4	7.7
7	U.Pe.	25	400	0.93	8.1	9.4
			750	0.87	7.2	9.2
8	I.Sch.	37	950	1.12	8.8	11.1
			1600	1.20	6.0	14.9
9	C.Sp.	23	1300	0.85	6.3	8.3
			1100	1.22	5.4	11.7
10	W.St.	35	600	0.81	4.0	16.9
11	H.St.	36	1450	0.99	7.4	16.3
12	I.St.	39	1450	1.30	3.7	10.4
			1500	1.64	2.7	7.9
13	T.We.	25	600	1.74	5.0	17.0
14	G.Kl.	46	1400	1.27	3.8	8.5
$\bar{X}$					5.5	11.3
+ S					1.7	4.0

Tah. 2

24-Stunden-Gesamtcorticoid- und 17-Ketosteroid-
ausscheidung endokrin gesunder Frauen

1.ACTH-Belastungstag

Nr.	Name	Alter in Jahren	Harn- menge ml	Krea- tinin g	Gesamtcor- ticoide mg	17-Keto- steroid- mg
1	W.Di.	40	1200	1.29	16.2	25.7
2	M.Ha.	23	600	0.73	7.3	15.6
3	H.Ke.	17	500	0.76	7.8	9.7
4	R.Na.	25	500	1.12	9.3	27.6
5	H.No.	44	1200	1.07	11.2	14.0
6	H.Or.	37	700	1.16	15.7	19.4
7	U.Pe.	25	500	1.06	5.8	20.2
8	I.Sch.	37	850	1.20	8.4	20.5
9	C.Sp.	23	1050	0.98	11.8	14.8
10	W.St.	35	650	1.15	10.2	23.0
11	H.St.	36	1350	1.34	11.3	29.3
12	I.St.	39	1350	1.50	11.3	10.0
13	T.We.	25	950	1.68	13.9	26.9
14	G.Kl.	46	850	1.17	12.4	17.2

$\bar{X}$

10.9

19.6

$\pm S$

3.0

6.4

p (Ruhe-/I.ACTH-Tg.)

<0.001

<0.001

Tab. 3

24-Stunden-Gesamtcorticoid- und 17-Ketosteroid-
ausscheidung endokrin gesunder Frauen

2. ACTH-Belastungstag

Nr.	Name	Alter in Jahren	Harn- menge ml	Krea- tinin g	Gesamtcor- ticoide mg	17-Keto- steroid mg
1	W.Di.	40	800	1.08	13.5	22.8
2	M.Ha.	23	1050	0.73	13.4	22.1
3	H.Ke.	17	900	1.42	13.4	20.0
4	R.Na.	25	550	1.18	12.7	30.4
5	H.No.	44	850	1.07	9.9	16.5
6	H.Or.	37	500	0.67	12.8	21.8
7	U.Pe.	25	500	0.86	7.0	19.4
8	I.Sch.	37	650	2.91	10.2	25.9
9	C.Sp.	23	2200	1.17		16.6
10	W.St.	35	950	0.91	8.9	26.2
11	H.St.	36	1150	0.97	19.8	37.6
12	I.St.	39	950	2.75	8.2	19.8
13	T.We.	25	500	1.39	8.3	18.5

$\bar{X}$ 11.5 22.9

$\pm S$ 3.5 6.0

p (Ruhe-/II. ACTH-Tg.) < 0.001 < 0.001

17-Ketosteroid - Fraktionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

Ruhetag
Prozentualwerte

Nr.	Name	Arte- fakte %	DHA %	Andro- steron %	Ätiocho- lanolon %	11-oxy- 17-Kst. %	Rest- frakt. %	A/Ä Quo- tient
1	W.Di.	12.4	9.3	23.0	27.0	17.3	11.0	0.85
2	M.Ha.	10.2	16.5	20.7	22.0	19.3	12.3	0.94
3	H.Ke.	18.6	8.4	23.2	22.6	15.4	11.8	1.03
4	R.Na.	6.0	14.2	22.4	30.2	20.6	6.6	0.74
5	H.No.	9.7	12.7	20.7	13.8	32.0	11.1	1.50
6	H.Or.	12.7	14.3	16.4	13.6	24.0	19.0	1.20
7	U.Pe.	8.9	16.3	18.5	23.5	22.9	9.9	0.79
8	I.Sch.	17.2	10.4	23.0	15.8	19.8	13.7	1.46
9	C.Sp.	13.8	12.9	18.1	23.4	14.6	17.2	0.77
10	W.St.	4.9	13.9	22.0	29.1	20.1	10.0	0.76
11	H.St.	6.0	17.5	25.5	16.6	25.4	9.0	1.54
12	I.St.	17.9	14.4	24.6	11.7	23.5	7.9	2.10
13	T.We.	8.7	13.2	30.0	19.7	17.6	10.8	1.53
14	G.Kl.	6.5	9.7	19.9	24.1	23.6	16.2	0.82
$\bar{X}$		11.0	13.1	22.0	20.9	20.3	11.9	1.07
$\pm S$		4.6	2.8	3.4	5.9	3.5	3.5	0.34

17-Ketosteroid-Fraktionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

1. ACTH-Belastungstag

Prozentualwerte

Nr.	Name	Arte- fakte %	DHA %	Andro- steron %	Ätiocho- lanolon %	11-oxy- 17-Kst. %	Rest- frakt. %	A/Ä Quo- tient
1	W.Di.	5.0	9.8	25.3	24.2	23.7	12.0	1.04
2	M.Ha.	5.9	17.9	19.8	28.2	17.9	10.3	0.70
3	H.Ke.	5.8	8.4	25.8	29.6	18.4	12.0	0.87
4	R.Na.	6.5	19.0	14.1	28.8	25.1	6.5	0.49
5	H.No.	7.3	14.9	16.8	15.9	35.0	10.0	1.06
6	H.Or.	11.5	10.9	21.3	16.8	27.8	11.7	1.27
7	U.Pe.	4.7	24.6	18.4	27.3	16.2	8.8	0.67
8	I.Sch.	7.6	11.9	21.5	17.7	26.9	14.4	1.23
9	C.Sp.	14.6	20.0	22.4	20.3	12.2	9.5	1.05
10	W.St.	4.4	14.1	21.3	28.0	18.1	14.1	0.76
11	H.St.	8.3	22.4	32.6	10.8	19.3	6.6	3.01
12	I.St.	8.9	15.4	27.6	12.4	29.1	6.6	2.22
13	T.We.	6.0	13.2	29.1	24.9	19.1	7.7	1.17
14	G.Kl.	8.0	10.8	20.0	45.1	18.4	3.7	0.44
	$\bar{X}$	7.5	15.2	22.6	22.0	20.9	9.6	1.00
	$\pm S$	2.8	4.9	5.0	6.8	5.2	3.1	0.48
	p(Ruhe-/ 1. ACTH)		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

17-Ketosteroid-Fraktionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

2. ACTH-Belastungstag

Prozentualwerte

Nr.	Name	Arte- fakte %	DHA %	Andro- steron %	Ätiocho- lanolon %	11-oxy- 17-Kst. %	Rest- frakt. %	A/Ä Quo- tient
1	W.Di.	3.6	6.5	26.6	32.4	19.9	11.0	0.82
2	M.Ha.	3.7	32.5	20.6	18.8	22.4	11.9	1.10
3	H.Ke.	10.4	11.1	21.5	19.8	26.4	10.8	1.08
4	R.Na.	9.3	26.0	18.4	20.4	19.5	6.4	0.90
5	H.No.	4.4	9.6	14.3	15.7	40.0	16.0	0.91
6	H.Or.	5.3	10.6	19.7	21.2	32.3	10.9	0.93
7	U.Pe.	5.3	25.3	21.2	23.8	16.6	7.8	0.89
8	I.Sch	12.1	11.8	16.6	14.2	29.5	15.8	1.17
9	C.Sp.	14.8	14.8	26.6	13.0	17.4	13.4	2.05
10	W.St.	3.8	9.6	24.0	29.9	22.1	10.6	0.80
11	H.St.	9.0	19.0	22.6	15.6	23.6	10.2	1.45
12	I.St.	16.2	16.6	20.0	11.1	28.4	7.7	1.80
13	T.We.	5.6	12.4	26.7	19.5	27.4	8.4	1.37
	$\bar{X}$	8.0	15.1	21.4	19.6	23.8	10.8	1.10
	$\pm S$	4.4	6.4	3.9	6.2	5.2	2.9	0.31
	p(Ruhe-/ 2. ACTH)		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

17-Ketosteroid-Fraktionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

Ruhetag

Androsteronäquivalente

Nr.	Name	DHA mg A.	Andro- steron mg A.	Ätiocho- lanolon mg A.	11-oxy- 17-Kst. mg A.	A/Ä Quotient
1	W.Di.	1.7	4.2	5.0	3.2	0.84
2	M.Ha.	1.8	2.3	2.4	2.1	0.96
3	H.Ke.	0.6	1.7	1.7	1.2	1.00
4	R.Na.	2.7	4.3	5.8	3.9	0.74
5	H.No.	0.9	1.5	1.0	2.3	1.50
6	H.Or.	1.1	1.3	1.0	1.9	1.30
7	U.Pe.	1.5	1.7	2.2	2.1	0.77
8	I.Sch.	1.2	2.6	1.8	2.2	1.44
9	C.Sp.	1.1	1.5	1.9	1.2	0.79
10	W.St.	2.4	3.7	4.9	3.4	0.75
11	H.St.	2.9	4.2	2.7	4.2	1.56
12	I.St.	1.0	1.7	0.8	1.6	2.12
13	T.We.	2.3	5.0	3.4	3.0	1.47
14	G.Kl.	0.8	1.7	2.0	2.0	0.85
	$\bar{X}$	1.6	2.7	2.6	2.4	1.07
	$\pm S$	0.8	1.3	1.6	0.9	0.33

17-Ketosteroid-Fractionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

1. ACTH-Belastungstag

Androsteronäquivalente

Nr.	Name	DHA mg A.	Andro- steron mg A.	Ätiocho- lanolon mg A.	11-oxy- 17-Kst. mg A.	A/Ä Quotient
1	W.Di.	2.5	6.5	6.2	6.1	1.05
2	M.Ha.	2.8	3.1	4.4	2.8	0.70
3	H.Ke.	0.8	2.5	2.9	1.8	0.86
4	R. N.	5.2	3.9	8.0	6.9	0.49
5	H.No.	2.1	2.4	2.2	4.9	1.09
6	H.Or.	2.1	4.1	3.3	5.4	1.24
7	U.Pe.	5.0	3.7	5.5	3.3	0.67
8	I.Sch.	2.4	4.4	3.6	5.5	1.22
9	C.Sp.	3.0	3.3	3.1	1.8	1.06
10	W.St.	3.2	4.9	6.4	4.2	0.76
11	H.St.	6.6	9.6	3.2	5.7	3.00
12	I.St.	1.5	2.8	1.2	2.9	2.33
13	T.We.	3.5	7.8	6.7	5.2	1.16
14	G.Kl.	1.8	3.5	7.8	3.2	0.44
	$\bar{X}$	2.8	4.1	4.6	4.3	1.01
	$\pm S$	1.3	1.6	2.1	1.6	0.50
	p	<0.05		<0.05	<0.001	>0.05
		(Ruhe-/1. ACTH-Tag)				

17-Ketosteroid-Fraktionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

2. ACTH-Belastungstag

Androsteronäquivalente

Nr.	Name	DHA mg A.	Andro- steron mg A.	Ätiocho- lanolon mg A.	11-oxy- 17-Kst. mg A.	A/Ä Quotient
1	W.Di.	1.5	6.1	7.4	4.6	0.82
2	M.Ha.	5.0	4.5	4.2	5.0	1.07
3	H.Ke.	2.2	4.3	4.0	5.3	1.08
4	R.Na.	7.9	5.6	6.2	6.0	0.90
5	H.No.	1.6	2.4	2.6	6.6	0.92
6	H.Or.	2.3	4.3	4.6	7.1	0.93
7	U.Pe.	4.9	4.1	4.6	3.2	0.89
8	I.Sch.	3.0	4.3	3.7	7.7	1.16
9	C.Sp.	2.3	4.2	2.0	2.7	2.10
10	W.St.	2.5	6.3	7.8	5.8	0.81
11	H.St.	7.2	8.5	5.9	8.9	1.44
12	I.St.	3.3	3.9	2.2	5.6	1.77
13	T.We.	2.3	4.9	3.6	5.1	1.36
$\bar{X}$		3.3	4.6	4.5	5.7	1.10
$\pm S$		1.7	1.1	1.8	1.7	0.25
p		<0.05	<0.001	<0.05	<0.001	>0.05
	(Ruhe-/2. ACTH-Tag)					

17-Ketosteroid-Fraktionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

Ruhetag

Absolutwerte

Nr.	Name	DHA mg	Andro- steron mg	Ätiocho- lanolon mg	11-oxy- 17-Kst. mg	A/Ä Quotient
1	W.Di.	1.05	4.23	5.20	1.79	0.81
2	M.Ha.	1.12	2.28	2.50	1.18	0.92
3	H.Ke.	0.37	1.74	1.77	0.67	0.95
4	R.Na.	1.67	4.28	6.03	2.18	0.72
5	H.No.	0.56	1.49	1.04	1.29	1.50
6	H.Or.	0.68	1.26	1.04	1.06	1.30
7	U.Pe.	0.93	1.70	2.29	1.18	0.74
8	I.Sch.	0.74	2.55	1.87	1.23	1.37
9	C.Sp.	0.68	1.50	1.98	0.67	0.75
10	W.St.	1.48	3.72	5.10	1.90	0.73
11	H.St.	1.80	4.16	2.81	2.35	1.50
12	I.St.	0.62	1.70	0.83	0.90	2.12
13	T.We.	1.42	5.12	3.54	1.68	1.46
14	G.Kl.	0.50	1.69	2.08	1.12	0.81
	$\bar{X}$	0.97	2.67	2.72	1.37	1.04
	$\pm S$	0.39	1.33	1.65	0.53	0.34

17-Ketosteroid-Fractionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

1. ACTH-Belastungstag

Absolutwerte

Nr.	Name	DHA mg	Andro- steron mg	Ätiocho- lanolon mg	11-oxy- 17-Kst. mg	A/Ä Quotient
1	W.Di.	1.55	6.50	6.45	3.42	1.01
2	M.Ha.	1.74	3.09	4.58	1.57	0.67
3	H.Ke.	0.50	2.50	3.02	1.01	0.83
4	R.Na.	3.22	3.89	8.32	3.86	0.47
5	H.No.	1.30	2.35	2.29	2.74	1.02
6	H.Or.	1.30	4.13	3.43	3.02	1.20
7	U.Pe.	3.10	3.72	5.72	1.85	0.65
8	I.Sch.	1.49	4.41	3.74	3.07	1.18
9	C.Sp.	1.86	3.32	3.22	1.01	1.02
10	W.St.	1.98	4.90	6.66	2.35	0.73
11	H.St.	4.09	9.55	3.35	3.19	2.91
12	I.St.	0.93	2.76	1.25	1.62	2.33
13	T.We.	2.17	7.83	6.97	2.91	1.11
14	G.Kl.	1.18	3.44	8.11	1.75	0.42
	$\bar{X}$	1.89	4.06	4.79	2.39	0.97
	$\pm S$	0.98	1.64	2.23	0.91	0.48
	p	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05
	(Ruhe-/1. ACTH-Tag)					

17-Ketosteroid-Fraktionen, Androsteron/
Ätiocholanolon-Quotient

2. ACTH-Belastungstag

Absolutwerte

Nr.	Name	DHA mg	Andro- steron mg	Ätiocho- lanolon mg	11-oxy- 17-Kst. mg	A/Ä Quotient
1	W.Di.	0.93	6.06	7.70	2.58	0.79
2	M.Ha.	3.10	4.55	4.37	2.80	1.04
3	H.Ke.	1.36	4.30	4.20	2.97	1.02
4	R.Na.	4.90	5.59	6.45	3.36	0.87
5	H.No.	0.99	2.36	2.70	3.70	0.89
6	H.Or.	1.43	4.30	4.78	3.98	0.90
7	U.Pe.	3.04	4.11	4.78	1.78	0.85
8	I. S.	1.86	4.30	3.85	4.31	1.13
9	C.Sp.	1.43	4.42	2.18	1.51	2.00
10	W.St.	1.55	6.29	8.11	3.25	0.78
11	H.St.	4.46	8.50	6.14	4.98	1.39
12	I.St.	2.05	3.94	2.29	3.14	1.69
13	T.We.	1.43	4.94	3.74	2.86	1.32
$\bar{X}$		1.97	4.60	4.76	3.17	1.06
$\pm S$		1.07	1.10	1.93	0.95	0.28
p		<0.05		<0.001	<0.001	>0.05
		(Ruhe-/2. ACTH-Tag)				

Vergleichende Zusammenstellung der Mittelwerte der Gesamt-17-Ketosteroide und der 17-Ketosteroid-Fraktionen und Androsteron/Ätiocholanolon-Quotienten in Prozent, mg Androsteron-Äquivalenten und Absolutmengen an den drei Untersuchungstagen

		Ruhetag	1.ACTH-Tag	2.ACTH-Tag
=====				
17-Ketosteroide	mg	11.3	19.6	22.9
DHA	%	13.1	15.2	15.1
	mgA.	1.6	2.8	3.3
	mg	0.97	1.89	1.97
Androsteron	%	22.0	22.6	21.4
	mg	2.67	4.06	4.60
Ätiocholanolon	%	20.9	22.0	19.6
	mgA.	2.6	4.6	4.5
	mg	2.72	4.79	4.76
11-oxy-17-Kst.	%	20.3	20.9	23.8
	mgA.	2.4	4.3	5.7
	mg	1.37	2.39	3.17
A/Ä-Quotient	%/%	1.07	1.00	1.10
	mgA.	1.07	1.01	1.10
	mgA./			
	mgÄ	1.04	0.97	1.06

24-Stunden-Ausscheidung von Gesamtcorticoiden
bei gesunden Frauen

Autor	Fall- zahl	Ruhetag mg/24Std	1.ACTH-Tag mg/24Std	2.ACTH-Tag mg/24Std
Eberlein et al.(1955)	7	13.0 (5.5-24.4)		
Raftopoulo et al.(1959)	150	10.2 (6.0-14.0)		
Pfeiffer (1959)	20	2.0-10.5	6.5-21.0	7.5-33.0
Hereth(1960)	40	5.34 (2.5-10.5)		
eigene Werte	14	5.5 ⁺ 1.7	10.9 ⁺ 3.0	11.5 ⁺ 3.5

Normalwerte für die 17-Ketosteroid-
Ausscheidung bei Frauen

Autor	Methode	Fall- zahl	Alter (Jahre)	mg/24Std
ENGSTROM (1943)	Callow	15	20-40	11.2 (5.8-17.0)
FORBES et al. (1947)	Callow	65	23-37	8.2 (3.8-16.9)
VENNING et al. (1947)	Holtorff Koch	12	21-38	11.0 (7.0-18.0)
HAMBURGER (1948)	Callow	20	20-30	10.0 (4.0-16.0)
DINGEMANSE et al. (1952)	Callow	75	18-46	10.9 (4.4-22.5)
POND (1954)	Callow			8 (4 - 14)
ZIMMERMANN (1955)	Zimmermann	89	30	11.0 (6.3-15.7)
DORFMAN (1956)	Holtorff Koch	30	20-40	12.6 (4.0-22.0)
JOHNSEN (1956)	Callow	52	21-45	9.49 (4.1-17.3)
WÜRTERLE (1957)	Drekter			9.45
BORTH et al. (1957)	Hamburger	82	30	8.0 (3.0-20.1)
FOGGIT et al. (1958)	Callow mod.	18		3.1-20.2
KELLER et al. (1958)	Drekter mod.			7.0-17.5

Autor	Methode	Fall- zahl	Alter (Jahre)	mg/24Std
PERLOFF et al. (1958)	Zimmerm. mod.			10.1 (6.2-15.7)
HERETH(1960)	Zimmerm. mod.	40		11.99 (3 - 25)
LANTHIER (1960)	Drekter	12	20-30	7.5 $\pm$ 2.1
VOIGT et al. (1960)	Holtorff Koch	14		8.17 (6.02-9.38)
v.ZERSSSEN et al. (1960)	Holtorff Koch	51		8.90 (6.02-11.78)
MARTIN et al. (1961)	Drekter mod.	9	20-40	7.2
KAISER et al. (1964)	Zimmer- mann	1335	30	8.8 (5.8-11.7)
eigene Werte	Zimmer- mann	14	17-46	11.3 $\pm$ 4.0

Normalwerte für die 17-Ketosteroid-
Ausscheidung bei Frauen unter ACTH-
Belastung

Autor	Methode	Fall- zahl	Alter (Jahre)	Ruhetag mg/24 Std.	1.ACTH- Tag mg/ 24Std.	2.ACTH- Tag mg/ 24Std.
PFEIF- FER (1959)	Zimmer- mann	20		6.0-24.0	7.8-31.5	9.0-32.5
LAN- THIER (1960)	Drek- ter	6	20-30	7.5 ⁺ 2.1		13.1-29.3
MARTIN et al. (1961)	Drek- ter mod.	9	20-40	7.2	17.6	24.1
eigene Werte	Zimmer- mann	14	17-46	11.3 ⁺ 4.0	19.6 ⁺ 6.4	22.9 ⁺ 6.0

ACTH-Belastung:

25 IE (Lanthier: 40 IE) wasserlösliches ACTH in 500 ml Glucose als Dauertropf über 8 Std. an 2 aufeinanderfolgenden Tagen.

Normalwerte der 17-Ketosteroid-Fractionen
und Androsteron/Ätiocholanolon-Quotienten
bei Frauen nach säulenchromatographischer
Trennung der 17-Ketosteroide

BIRKE und PLANTIN (1954)

Fr. 5- 7 (DHA).....	6.9 % $\pm$ 0.6
Fr.11-24 (Andro.u.Ätio.).....	62.9 % $\pm$ 1.6
Fr.35-38 (11-oxy-17-Kst.).....	10.7 % $\pm$ 1.1

POND (1954)

ß-Fraktion (DHA)	20 %
Andro.u.Ätio.	66 %
11-oxy-17-Kst.	9 %
A/Ä-Quotient... 0.9 (0.7-1.4)	

JOHNSEN (1956)

Artefakte.....	4% (1- 8)...	0.3 mg(0.1-0.9)
DHA	15% (8-35)...	1.6 mg(0.5-4.5)
Androsteron	22% (12-35)...	2.4 mg(0.8-5.6)
Ätiocholanolon	27% (13-44)...	2.6 mg(0.6-6.5)
Restfraktion	30% (18-49)...	3.0 mg(1.2-6.0)
(=11-oxy. u. Rest)		
A/Ä-Quotient... 0.97 (0.50-1.70)		

Fortsetzung Tab. 17

KELLER und HAUSER (1958)

Fr.A (Artefakte u. unbek. St.)	12-25 %
Fr.B (DHA)	7-20 %
Fr.C (Andro.u.Ätio.)	30-50 %
Fr.D (11-oxy-17-Kst.)	15-35 %

Normalwerte der 17-Ketosteroid-Fractionen
und Androsteron/Ätiocholanolon-Quotienten
bei Frauen nach säulenchromatographischer
Trennung der 17-Ketosteroide

STAIB und SCHILD (1958 b)

Fr.1 (nicht identifiziert) ..	10.8 %	$\pm$ 1.8
Fr.2-3 (nicht identif.)	6.7 %	$\pm$ 3.4
Fr.4 (DHA)	8.7 %	$\pm$ 6.0
Fr.5 (Androsteron)	20.7 %	$\pm$ 3.9
Fr.6 (Ätiocholanolon)	31.3 %	$\pm$ 7.1
Fr.6a (11-oxy-17-Kst.)	2.0 %	$\pm$ 1.3
Fr.7 (" " ")	14.3 %	$\pm$ 7.3
Fr.8 (" " ")	5.7 %	$\pm$ 1.7
Rest	0.6 %	$\pm$ 1.2
A/Ä-Quotient	0.66	

HUSSLEIN und SCHÜLLER (1959)

Artefakte	0.2-0.8 mg/24Std
DHA	0.5-3.5 mg/24Std
Androsteron	1.5-5.0 mg/24Std
Ätiocholanolon	0.5-6.5 mg/24Std

KARL (1960)

DHA	8-17 %
Androsteron	24-36 %
Ätiocholanolon	22-34 %
Restfraktion	7-19 %

Normalwerte der 17-Ketosteroid-Fraktionen
und Androsteron/Ätiocholanolon-Quotienten
bei Frauen nach säulenchromatographischer
Trennung der 17-Ketosteroide

v. ZERSSEN et al. (1960)

Fr.1 (Artefakte).....	6.00%		0.47 mg	$\pm$ 0.27
Fr.2 (nicht identif.)...	1.75%		0.16 mg	$\pm$ 0.21
Fr.3 (DHA)	16.23%		1.33 mg	$\pm$ 0.51
Fr.4 (Androsteron).....	26.93%		2.37 mg	$\pm$ 0.99
Fr.5 (Ätiocholanolon)...	34.82%		2.85 mg	$\pm$ 0.87
Fr.6 (11-oxy-17-Kst.)...	8.74%		0.71 mg	$\pm$ 0.22
Fr.7 (nicht identif.)...	4.03%		0.32 mg	$\pm$ 0.19
A/Ä-Quotient ...	0.89			$\pm$ 0.34

Eigene Werte

Artefakte.....	11.0 %	$\pm$ 4.6		
DHA.....	13.1 %	$\pm$ 2.8	... 1.6 mg	$\pm$ 0.8
Androsteron.....	22.0 %	$\pm$ 3.4	... 2.7 mg	$\pm$ 1.3
Ätiocholanolon.....	20.9 %	$\pm$ 5.9	... 2.6 mg	$\pm$ 1.6
11-oxy-17-Kst.	20.3 %	$\pm$ 3.5	... 2.4 mg	$\pm$ 0.9
Restfraktion.....	11.9 %	$\pm$ 3.5		
A/Ä-Quotient ...	1.07	$\pm$ 0.33		

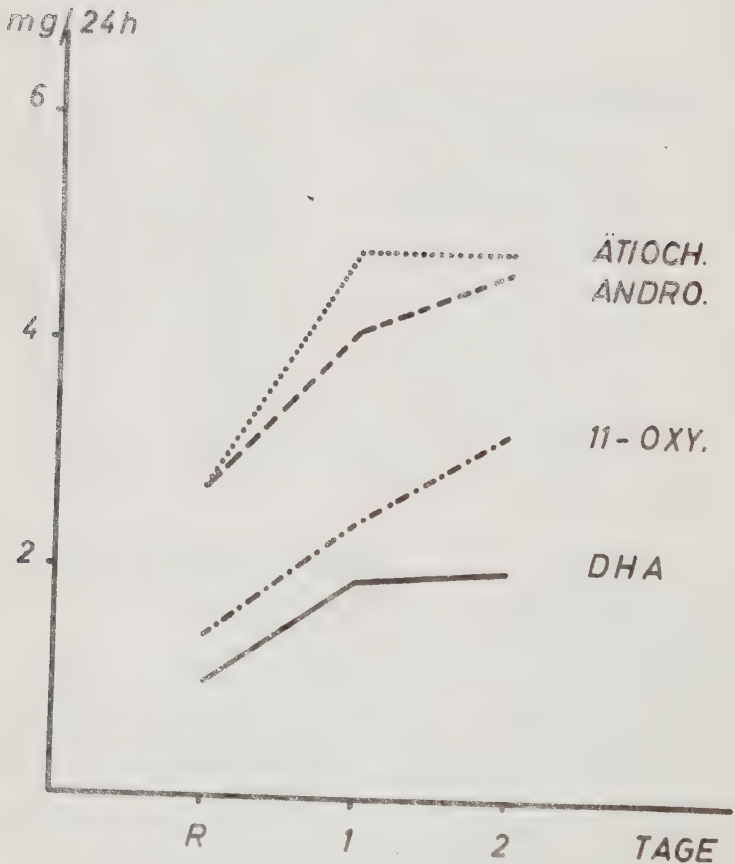


Abb.1: Mittelwerte der Fraktionen DHA, Androsteron, Ätiocholanolon und 11-oxygenierte 17-Ketosteroide am Ruhetag (R), am 1. (1) und am 2. (2) ACTH-Belastungstag in mg/24 Std. Alle Fraktionen zeigen einen signifikanten Anstieg unter ACTH-Belastung.

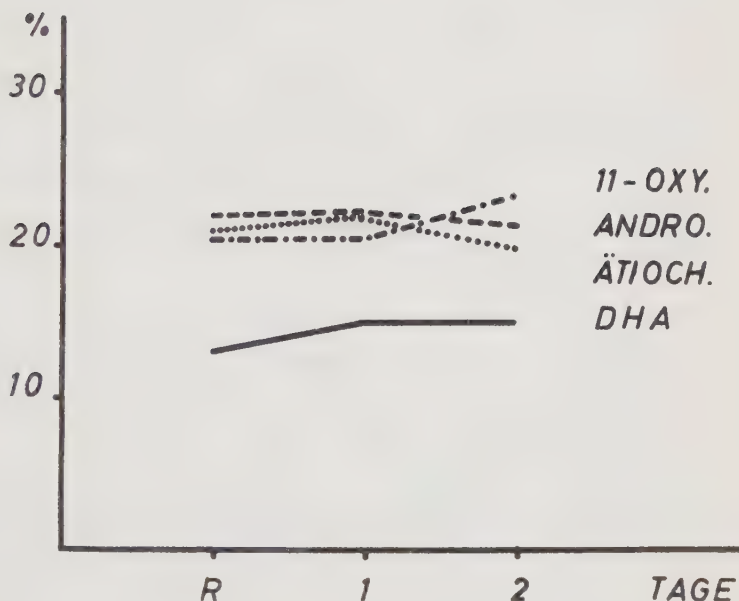


Abb. 2: Mittelwerte der Fraktionen DHA, Androsteron, Ätiocholanolon und 11-oxygenierte 17-Ketosteroide am Ruhetag (R), am 1. (1) und 2. (2) ACTH- Belastungstag in Prozent der Gesamtausscheidung der 17-Ketosteroide. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Verteilung der Fraktionen an den drei Untersuchungstagen.

Literaturverzeichnis

Addison, T.: On the disease of the supraadrenal capsules.

London Med. Gaz. 43., 517 (1855)

Bierich, J.R., D.Schönberg, E.Eckler: Untersuchungen zur Dynamik des Hypophysen-Nebennierenrindensystems.

Dtsch. med. Wschr. 87., 8, 84 (1962)

Birke, G., L.O.Plantin: Some aspects on the steroid metabolism.

Acta med. Scand. 147., Suppl. 287, 31 (1953)

Birke, G., L.O.Plantin: Studies on urinary 17-ketosteroids.

Acta med. Scand. 148., Suppl. 291 (1954)

Borth, R., A.Linder, A.Riondel: Urinary excretion of 17-hydroxycorticosteroids and 17-ketosteroids in healthy subjects, in relation to sex, age, body weight and height.

Acta endocrinol. 25., 33 (1957)

Brodish, A.: Diffuse hypothalamic system for the regulation of ACTH secretion.

Endocrinology 73., 727 (1963)

Brown-Sequard, C.E.: Experimental research on the physiology and pathology of the adrenal capsules.

C.Z.Soc. Biol. 43., 422, 542 (1856)

Bryan, G.T. , B.Kliman , J.R.Gill , F.C.Bartter:
Effect of human renin on aldosterone secretion
rate in normal man and in patients with the syn-
drome of hyperaldosteronism, iuxtaglomerular
hyperplasia and normal blood pressure.
J.clin. Endocrinol. 24., 729 (1964)

Burstein, S.H. , S.Lieberman: Hydrolysis of keto-
steroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures.
J.biol.Chem. 233., 331 (1958)

Bush, I.E.: The chromatography of steroids.
Pergamon Prss, Oxf.Lond., New York, Paris, 1961

Callow, N.H.: The isolation of two transformation
products of testosterone from urine.
Biochem.J. 33., 559 (1939)

Callow, N.H. , R.K.Callow , C.W.Emmens: Colori-
metric Determination of substances containing the
grouping CH_2CO in urine extracts as an indication
of androgen content.
Biochem.J. 32., 1312 (1938)

Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology:
Synthesis and metabolism of adrenocortical
steroids.
Ed.by: G.E.Wolstenholme, M.P.Cameron, W.Klyne ,
Vol.VII , Churchill, London, 1953

Crabbé, J. , W.J.Reddy , E.J.Ross , G.W.Thorn:
The stimulation of aldosterone secretion by adre-
nocorticotrophic hormone (ACTH).
J.clin.Endocrinol. 19., 1185 (1959)

Critchlow, V. , H.S.Lipscomb , R.Guillemin: Effect of CRF on maintenance of the adrenocorticotrophic function of anterior pituitary grafts.
J.Endocrinol. 25., 465 (1963)

Davidson, J.M. , S.Feldman: Cerebral involvement in the inhibition of ACTH secretion by hydrocortisone.
Endocrinology 72., 936 (1963)

De Laat, B.M.: Colorimetric estimation of male substances.
Acta brev.néerl. 11., 51 (1941)

De Paoli, I.C. , E.Nishizawa , K.B.Eik-Nes: Hydrolysis of conjugated 17-ketosteroids.
J.clin.Endocrinol. 23., 81 (1963)

Dingemanse, E: Steroid metabolism and estimation. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. Ed. by: G.E.Woistenholme, M.P.Cameron , Vol.II , Churchill, London , 1952, p.251

Dingemanse, E. , L.G.Huis in't Veld , B.M.De Laat: Clinical method for the chromatographic-colorimetric determination of urinary 17-ketosteroids.
J.clin.Endocrinol.6., 545 (1946)

Dingemanse, E. , L.G.Huis in't Veld , S.L.Hartogh-Katz: Clinical method for chromatographic-colorimetric determination of urinary 17-ketosteroids; normal adults.
J.clin.Endocrinol. 12., 66 (1952)

Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen. I.R.Geigy AG , Basel 1955

Dorfman, R.I.: Biosynthesis of Androgens and estrogens.

Medicine of Japan , Vol. I, p.707, 1959

Dorfman, R.I.: Biosynthesis of adrenocortical steroids.

Cancer, 10., 741 (1957)

Dorfman, R.I.: Assay of 17-ketosteroids and testosterone.

In: R.I.Dorfman (ed.): Methods in hormone research, I , Academic Press, N.Y. 1962 , p.51

Dorfman, R.I. , R.A.Shipley: Androgens.

John Wiley & Sons, Inc. New York, 1956

Eberlein, W.E. , A.M.Bongiovanni: Partial characterization of urinary adrenocortical steroids in adrenal hyperplasia.

J.clin.Invest. 34., 1337 (1955)

Engstrom, W.W. , H.L.Mason: Study of colorimetric assay of urinary 17-ketosteroids.

Endocrinology 33., 229 (1943)

Farrell, G.: The control of aldosterone secretion: influence of the epiphysis cerebri.

Acta endocrinol. 34., Suppl.50, 57 (1960)

Farrell, G.L. , W.M.Mc.Isaac: Adrenoglomerulotropin.

Arch.Biochem.94., 543 (1961)

Farrell, G.L. , A.N.Taylor: Neuroendocrine aspects of blood volume regulation.

Ann.rev. physiol. 24., 471 (1962)

Fieser, L.F. , M.Fieser: Steroide
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. , 1961
(übersetzt v. H.Grünewald)

Foggitt, F. , A.W.Steinbeck: Normal adrenocortical
response to corticotropin.
Acta endocrinol. 29., 347 (1958)

Forbes, A.P. , E.C.Donaldson , E.C.Reifenstein jr. ,
F.Albright: Effect of trauma and disease on urinary
17-ketosteroid-excretion in man.
J.clin.Endocrinol. 7., 264 (1947)

Forchielli, E.: Androgen biosynthesis by human
ovaries and adrenal tissue in vitro.
In: International congress on hormonal steroids,
p.14
Excerpt.Med. Internat.Congr.Ser. 51 , 1962

Genest, I.: Angiotensin, aldosterone and human
arterial hypertension.
Canad.Med.Ass.J. 84., 403 (1961)

Goldstein, M. , M.Gut , R.I.Dorfman: Conversion
of pregnenolone to dehydroepiandrosterone.
Biochim.Biophys.Acta 38., 190 (1960)

Goldzieher, J.W. , L.R.Axelrod: The polycystic
ovary II. Urinary steroid excretion.
J.clin.Endocrinol. 22., 425 (1962)

Gross, F.: Renin und Hypertensin, physiologische
oder pathologische Werkstoffe?
Klin.Wschr.36., 693 (1958)

Guillemin, R.: Biochemie und Physiologie der hypothalamischen Hormone.

71. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. , 1965 , Wiesbaden

Guillemin, R. , B. Rosenberg: Humoral hypothalamic control of anterior pituitary. A study with combined tissue cultures.

Endocrinology 57., 599 (1955)

Guillemin, R. , A. V. Schally: A re-evaluation of the in vitro pituitary systems on assay for corticotrophin releasing factor.

Endocrinology 65., 555 (1959)

Guillemin, R. , W. E. Dear , B. Nichols jr. , H. S. Lipscomb: ACTH-releasing activity in vivo of a CRF preparation and of lysinvasopressin.

Proc. Soc. Exp. Biol. 101., 107 (1959)

Hamburger, C.: Normal urinary excretion of neutral 17-ketosteroids with special reference to age and sex variations.

Acta endocrinol. 1., 19 (1948)

Hamman, B. L. , M. M. Martin: Separation of six urinary 17-ketosteroids by two-dimensional thin layer chromatography: Control values and response to ACTH.

J. clin. Endocrinol. 24., 1195 (1964)

Harris, G. W.: Entwicklung und heutiger Stand der Neuroendokrinologie.

Dtsch. med. Wschr. 90., 61 (1965)

Hayano, M. , N.Saba , R.I.Dorfman , O.Hechter:
Some aspects of the biogenesis of adrenal steroid
hormones.

Rec.Progr.Hormone Res. 12., 79 (1956)

Hechter, O. , G.Pincus: Genesis of the adrenocor-
tical secretion.

Physiol.Rev. 34., 459 (1954)

Hereth, B.: Untersuchungen an Gesunden über die Ab-
hängigkeit der 17-Ketosteroid- und Gesamtcorticoid-
Ausscheidung im Urin von Geschlecht, Alter, Konsti-
tution und vegetativer Tonuslage.

Inaugural-Diss. , Frankfurt/Main, 1960

Hodges, J.R. , M.T.Jones: Some observations on the
role of corticosteroids in controlling the adreno-
corticotrophic activity of the pituitary gland.

Proc.Soc.Endocrinol. 96.Meeting, 1964

in: J.Endocrinol. 31., (1965)

Hoff, F.: Klinische Probleme der vegetativen Re-
gulation und der Neuralpathologie.

Dtsch. med.Wschr. 77., 65 , 112 , 146 (1952)

Hoff, F.: Klinische Physiologie und Pathologie
6.Aufl. , Thieme, Stuttgart, 1962

Holtorff, A.F. , F.C.Koch: Colorimetric estima-
tions of 17-ketosteroids and their application to
urine extracts.

J.Biol.Chem. 135., 377 (1940)

Hübener, H.J. , W.H.Staib: Biochemie der Nebennierenrinden-Hormone.
G.Thieme Verl., Stuttgart, 1965

Husslein, H. , E.Schüller: Virilisierung und Hirsutismus.
Wien.klin.Wschr. 71., 579 (1959)

Jacobsohn, G.M. , S.Lieberman: Studies on the chemical cleavage of the urinary glucuronosides of the 17-ketosteroids.
J.Biol. Chem. 237., 1469 (1962)

Jefferies, W.M. K. , A.M.Michelakis: Individual patterns of urinary 17-ketosteroid fractions.
Metabolism 12., 1017 (1963)

Jenkins, D. , P.H.Forsham , J.C.Laidlaw , W.J.Reddy, G.W.Thorn: Use of ACTH in diagnosis of adrenal cortical insufficiency.
Amer.J.Med. 18., 3 (1955)

Johnsen, S.G.: Fractionation of urinary 17-ketosteroids.
Acta endocrinol. 21., 127 , 146 , 157 (1956)

Kaiser, E. , W.Bindt , K.H.Conrad , W.Zimmermann: Normalausscheidung von 17-Ketosteroiden im Harn beim Menschen.
Acta endocrinol. 47., 285 (1964)

Kappas, A. , T.F.Gallagher: Studies in steroid metabolism. The α -ketosteroid excretion pattern in normal females and the response to ACTH.
J.clin.Invest. 34., 1566 (1955)

Karl, H.J.: Die Funktion der Nebennierenrinde bei Frauen mit Hirsutismus und Cyclusstörungen.

Klin.Wschr. 38., 634 (1960)

Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
G.Thieme Verl., Stuttgart, 1961

Keller, M., A.Hauser : Der Klinische Wert der chromatographischen Fraktionierung der neutralen 17-Ketosteroide in der Gynäkologie.

Arch. Gyn. 190., 241 (1958)

Kendall, E.C.: Metabolic processes influenced by certain ductless glands.

Proc.Mayo Clin. 13., 379 (1938)

Kuhn, E. , H.J.Staudinger: 17-Ketosteroide und ihre Fraktionen bei myotonischer Dystrophie.

Klin.Wschr. 38., 327 (1960)

Labhart, A: Klinik der Inneren Sekretion

Springer Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg 1957

Lakshmanan, T.K. , S.Lieberman: An improved method of gradient elution chromatography and its application to the separation of urinary ketosteroids.

Arch.Biochem. 53., 258 (1954)

Lanthier, A.: Urinary 17-ketosteroids in the syndrome of polycystic ovaries and hyperthecosis.

J.clin.Endocrinol. 20., 1587 (1960)

Lehnert, G. , H.Valentin , H.Deutzmann: Steroid-analytische Untersuchungen zur Frage der Nebennierenrindenreaktion auf körperliche Arbeit.

71.Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. , Wiesbaden 1965

Levy, H. , R.W.Jeanloz , R.P.Jakobson , O.Hechter ,
V.Schenker , G.Pincus: Chemical transformation
of steroids by adrenal perfusion; progesterone,
17 α -hydroxyprogesterone and pregn-5-en-3 β -ol-20-one.
J.Biol.Chem. 211., 867 (1954)

Li, C.H. , M.H.Evans , M.E.Simpson: Adrenocorti-
cotropic hormone.
J.Biol.Chem. 149., 413 (1943)

Lieberman, S. , L.B.Hariton , P.Humphries , C.P.
Rhoads, K.Dobriner: Studies in steroid meta-
bolism. The isolation from human urine of Δ 9-
17-ketosteroids.
J.Biol.Chem. 196., 793 (1952)

Lieberman, S. , B.Mond , E.Smyles: Hydrolysis of
urinary ketosteroid conjugates.
Rec.Progr.Horm.Res. 9., 113 (1954)

Lombardo, M.E. P.B.Hudson: The biosynthesis of
adrenocortical hormones by the human adrenal gland
in vitro.
Endocrinology 65., 417 (1959)

Mahesh, V.B. , R.R.Greenblatt , C.K.Aydar , S.Roy ,
R.A.Puebla: Urinary steroid excretion patterns
in hirsutism. I. Use of adrenal and ovarian
suppression tests in the study of hirsutism.
J.clin.Endocrinol. 24., 1283 (1964)

Martin, M.M. , W.J.Reddy , G.W.Thorn: Method for
the simultaneous determination of pregnanediol and
pregnanetriol: estimation of urinary excretion in
normal subjects and in ten patients with adreno-
cortical disorders.
J.clin.Endocrinol. 21., 923 , (1961)

Mason, H.L. , W.M.Hoehn, E.C.Kendall: Chemical studies of the suprarenal cortex. IV Structures of compounds C,D,E,F and G.
J.Biol.Chem.124., 459 (1938)

Mulrow, P.J. , G.L.Cohn: Conversion of corticosterone-4-C14 to aldosterone by human adrenal slices.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 101., 731 (1959)

Mulrow, P. , W.F.Ganong , G.Cera , A.Kuljian: The nature of the aldosterone stimulating factor in dog kidneys.
J.clin.Invest. 41., 505 (1962)

Mulrow, P. , Ganong, W.F. , A.Boryczka: Further evidence for a role of the renin-angiotensin system in regulation of aldosterone secretion.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 112., 7 (1963)

Paaby, H.: The excretion of total neutral 17-ketosteroids and of dehydroisoandrosterone post-operatively.
Acta endocrinol.21., 337 (1956)

Perloff, W.H. , B.J.Channick, B.Suplick , E.R.Carrington: Clinical management of idiopathic hirsutism (adrenal virilism).
J.Amer.Med.Assoc. 167., 2041 (1958)

Péron, F.G.: Adrenocorticoids.
In: Methods of hormone research, R.I.Dorfman (ed.), Academic Press, New York, Vol.I, 1962, p.199

Pfeiffer, E.F.: Die Bedeutung der Hormonanalysen für Diagnose und Therapie.
Therapiewoche , 9 , 12 , 18 (1959)

Pfeiffer, E.F.: Diagnose und derzeitige Behandlung der Addison'schen Krankheit.
Dtsch.med.Wschr. 86., 791 (1961)

Pfiffner, J.J.: Adrenal cortical hormones.
Advanc.Enzymol. 2., 325 (1942)

Pond, M.H.: A microchromatographic method for the separation of 17-ketosteroids in human urine.
The Lancet 1951/II, p.906

Pond, M.H.: 17-ketosteroid fractionation studies by a microchromatographic technique in endocrine disorders.
J.Endocrin. 10., 202 (1954)

Prunty, F.F.G.: Chemical and clinical problems of the adrenal cortex.
Brit.med.J. 2., 615 (1956)

Raftopoulos, R. , H.J.Staudinger , L.Weissbecker:
Methoden zur Corticoidbestimmung im menschlichen Harn. Überblick und vergleichende Untersuchungen.
Clin.chim.Acta 4., 463 (1959)

Reichstein, T.: On the constituents of the adrenal cortex. X Corticosterone.
Helv.chir.Acta 20., 953 (1937)

Reichstein, T.: Chemie des Cortins und seiner Begleitstoffe.
Erg.Vit.Horm.forsch. 1., 334 (1938)

Reichstein, T. , C.W.Shoppee: Hormones of adrenal cortex.
Vitam. and Horm. 1., 345 (1943)

Renold, A.E. , D.Jenkins , P.H.Forsham , G.W.Thorn:
The use of intravenous ACTH; a study in quantitative
adrenocortical stimulation.
J.clin.Endocrinol. 12., 763 (1952)

Rogoff, J.M. , G.N.Stewart: Studies on adrenal
insufficiency in dogs; influence of adrenal ex-
tracts on survival period of adrenalectomized dogs.
Amer.J.Physiol. 84., 660 (1928)

Saba, N.: The biosynthesis and secretion of adre-
nocortical steroids.
Biochem.Soc.Symp. 18, Cambridge 1960 , p.96

Saba, N. , O.Hechter: Cholesterol-4C14 metabolism
in adrenal homogenates.
Fed.Proc. 14., 775 (1955)

Saffran, M. , A.V.Schally: Release of corticotro-
pin by anterior pituitary tissue in vitro.
Canad.J.Biochem. 33., 408 (1955)

Saffran, M. , A.V.Schally , B.G.Bentley: Stimula-
tion of release of corticotropin from adenohipophy-
sis by neurohypophyseal factor.
Endocrinology, 57., 439 (1955)

Sayers, G. , A.White , C.N.H.Long: Preparation
and properties of pituitary adrenotropic hormone.
J.Biol.Chem. 149., 425 (1943)

Sayers, G. , M.A.Sayers: Pituitary-adrenal system.
Rec.Progr.Horm.Res. 2., 81 (1948)

Schäfer, L.L.: Die Zuverlässigkeit einiger Funktionsprüfungen der Nebennierenrinde.

Dtsch.med.Wschr. 86., 2257 (1961)

Schöffling, K. , E.F.Pfeiffer, C.Robe , H.J.Pallaske: Steroidhormon-Untersuchungen bei Diabetikern mit sekundärem Hypogonadismus.

Dtsch.med.Wschr. 86., 819 (1961)

Scheuingart, D.E. , R.I.Gregerman , J.W.Conn: A comparison of increased adrenocortical function in obesity and in Cushing's syndrome.

Metabolism 12., 484 (1963)

Simpson, S.A. , J.F.Tait, A.Wettstein , R.Neher , J.von Euw , O.Schindler , T.Reichstein: Aldosteron. Isolierung und Eigenschaften. Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe.

XCI.

Helv.chim Acta 37., 1163 (1954) a

Simpson, S.A. , J.F.Tait , A.Wettstein , R.Neher , J.von Euw , O.Schindler , T.Reichstein: Die Konstitution des Aldosterons. Über Bestandteile der Nebennierenrinde und verwandte Stoffe. XCII.

Helv.chim.Acta 37., 1200 (1954) b

Simpson, S.A. , J.F.Tait , A.Wettstein , R.Neher , J.von Euw , O.Schindler , T.Reichstein: Konstitution des Aldosterons, des neuen Mineralocorticoids. Experientia 10., 132 (1954) c

Slater, J.D. , B.H.Barbour , H.H.Henderson , A.G.T. Casper , F.C.Bartter: Influence of the pituitary and the renin-angiotensin-system on the secretion of aldosterone, cortisol, and corticosterone. J.clin.Invest. 42., 1504 (1963)

Staib, W.: Steroidbestimmungen in Körperflüssigkeiten.

Dtsch.med.Wschr. 87.; 498 , 548 (1962)

Staib, W. , W.Schild: 17-Ketosteroidbestimmungen im Harn. I.Mitteilung. Erfahrungen über die Fraktionierung des neutralen Harnextraktes mittels Gradienten-Elutions-Chromatographie nach Lakshmanan u. Lieberman.

Klin.Wschr. 36., 166 (1958) a

Staib, W. , W.Schild: 17-Ketosteroidbestimmungen im Harn. II.Mitteilung. Vergleichende Untersuchungen über die Verteilung der 17-Ketosteroide im Harn von gesunden und krebserkrankten Frauen unter verschiedenen Hydrolysebedingungen.

Klin.Wschr. 36., 600 (1958) b

Staudinger, H.J. , M.Schmeisser: Bestimmung der Nebennierenrindenhormone im Harn.

Biochem.Z. 321., 83 (1950/51)

Staudinger, H. , M.Schmeisser: Quantitative chemische Bestimmung der Nebennierenrindenhormone.

Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 283., 54 (1948)

Staudinger, H.J. , V.Bauer: Zur Bestimmung der an Glucuronsäure gebundenen Corticoide im Harn.

Klin.Wschr. 32., 330 (1954)

Stone, D., O. Nechter: Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: site of action of ACTH in corticosteroidogenesis.

Arch. Biochem. Biophys. 51., 457 (1954)

Swingle, W.W. , J.J. Pfiffner: Studies on adrenal cortex: aqueous extract of adrenal cortex, which maintains life of bilaterally adrenalectomized cats. Am. J. Physiol. 96., 164 (1931)

Swingle, W.W. , J.J. Pfiffner: On cortical hormones of adrenal gland.

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 28., 510 (1931)

Tamm, J.: Zur Pathogenese des Cushing-Syndroms infolge bilateraler Nebennierenrinden-Hyperplasie. Dtsch. med. Wschr. 86., 1874 (1961)

Tamm, J.: Methodik, Fehlerquellen und Deutung der Corticosteroidbestimmung im Harn.

Der Internist 4., 559 (1963)

Teich, S.; J. Rogers , S. Lieberman , L. Engel , J.W. Davis: The origin of 3,5-Cycloandrostan-6 β -ol, 17-one in urinary extracts.

J. Amer. Chem. Soc. 75., 2523 (1953)

Venning, E. , J.S.L. Browne: Excretion of glyco-genic corticoids and of 17-ketosteroids in various endocrine and other disorders.

J. clin. Endocrin. 7., 79 (1947)

Voigt, K.D. , W. Schröder, J. Beckmann , H. Rosenkilde: Untersuchungen zur Ausscheidung von 17-Ketosteroiden und Corticoiden bei Gesunden und unter pathologischen Bedingungen.

Dtsch. Arch. f. klin. Med. 202., 1 (1955)

Voigt, K.D. , A.Oriol-Bosch , J.Tamm: Untersuchungen über den Einfluß einer intravenösen ACTH-Infusion auf die Plasma- und Urinsteroide von behandelten und unbehandelten Patienten mit Cushing Syndrom.

Klin.Wschr. 38., 206 (1960)

Weissbecker, L.: Die Funktionsprüfung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems mit Depot-ACTH. Dtsch.med.Wschr. 80., 151 (1955)

Wettstein, A.: Nebennierenrindenhormone und ihre Derivate.

M Schr.Kinderheilk. 108., 164 (1960)

Wintersteiner, O. , J.J.Pfiffner: Chemical studies on adrenal cortex; isolation of several physiologically inactive crystalline compounds from active extracts.

J.Biol.Chem.111., 599 (1935)

Würterle, A.: Zur Altersabhängigkeit der Ausscheidung von 17-Ketosteroiden bei der Frau.

5.Symp.Dtsch.Ges. f. Endocrinol. p.141, Freiburg 1957

Zerssen, v.D.: Zur Ätiologie und Pathogenese des gewöhnlichen Hirsutismus.

Schweiz.med.Wschr. 47., 1333 (1960)

Zerssen, v.D. , A.W.Meyer , D.Ahrens: Klinische, biochemische und psychologische Untersuchungen an Patientinnen mit gewöhnlichem Hirsutismus.

Dtsch.Arch.f.klin.Med. 206., 334 (1960)

Zimmermann, W.: Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre Anwendung zur quantitativen colori-

metrischen Bestimmung.

Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 233., 257 (1935)

Zimmermann, W.: Die 17-Ketosteroide, ihre Bedeutung und die Methode ihrer Bestimmung.

Dtsch.med.Wschr. 76., 1363 (1951)

Zimmermann, W. , H.U.Anton , D.Pontius: Die Eliminierung störender Chromogene bei der Bestimmung der 17-Ketosteroide mit m-Dinitrobenzol.

Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 289., 91 (1952)

Zimmermann, W.: Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten.

Springer, Berlin 1955 a

Zimmermann, W.: Chemie und Stoffwechsel der Steroidhormone. In: Handbuch der Inneren Medizin.

4.Aufl., Bd.VII/1 , Springer, Berlin, 1955 b

Zimmermann, H.; W.Staib , H.Pelzer: III.Mitteilung. Ein Beitrag zur säulenchromatographischen Fraktionierung der Harn-17-Ketosteroide nach Johnsen.

Klin.Wschr. 36., 982 (1958)

Zimmermann, H. , H.Lins: Zur Differentialdiagnose und Therapie des idiopathischen Hirsutismus.

65.Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med., 1959 , p.174

Herrn Prof. Dr. med. E.F.Pfeiffer danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für den Arbeitsplatz in der Abteilung für Klinische Endokrinologie der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt/Main.

Für die Anleitung bei der Durchführung und Zusammenstellung der Arbeit danke ich Herrn Dr. med. H.-J. Pallaske.

Frau Christiane Nierle danke ich für die Einführung in die Methoden der Steroidhormon-Bestimmung.

Lebenslauf

Ich, Ruth Müller-Ruchholtz, geb. Nagel, wurde am 17. Februar 1937 als Tochter des Bäckermeisters Vinzenz Nagel und seiner Ehefrau Anna, geb. Wiegand, in Stuttgart geboren. Im Februar 1957 legte ich an der Liebfrauenschule in Bensheim/Bergstraße die Reifeprüfung ab. Vom Sommersemester 1957 bis zum Wintersemester 1962/63 studierte ich Medizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main und bestand dort im Juli 1963 die Ärztliche Prüfung. Vom 1. September 1963 bis zum 31. August 1965 arbeitete ich als Medizinalassistentin in Kiel. Seit Juni 1964 bin ich mit Dr. Dr. Wolfgang Müller-Ruchholtz verheiratet. Im Dezember 1965 wurde unser erstes Kind geboren.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Säulenchromatographische Fraktionierung der 17-Ketosteroide gesunder Frauen in Ruhe und unter ACTH-Belastung"

in der Abteilung für Klinische Endokrinologie der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Prof.Dr.med. E.F.Pfeiffer mit Unterstützung durch Herrn Dr.med. Pallaske ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation bisher vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) nicht veröffentlicht.

Kiel, den 28.5.1966

Rüdiger Wüller-Rückholz

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Prof.Dr. Starck	Anatomie	
Prof.Dr. Ortmann	"	
Prof.Dr. Frick	"	
Prof.Dr. Wezler	Physiologie	
Prof.Dr. Greven	"	
Prof.Dr. Felix	Physiologische Chemie	
Prof.Dr. Róka	"	"
Prof.Dr. Zahn	"	"
Priv.doz.Dr. Hübener	"	"
Prof.Dr. Czerny	Physik	
Prof.Dr. Müser	"	
Prof.Dr. Dänzer	"	
Prof.Dr. Royen	Chemie	
Prof.Dr. Wieland	"	
Prof.Dr. Ried	"	
Prof.Dr. Halbsguth	Botanik	
Prof.Dr. Giersberg	Zoologie	
Prof.Dr. Kramp	Genetik	
Prof.Dr. Rotter	Pathologie	
Prof.Dr. Sandritter	"	
Prof.Dr. Lapp	"	
Prof.Dr. Kahlau	"	
Prof.Dr. Holtz	Pharmakologie	
Priv.doz.Dr. Westermann	"	
Prof.Dr. Hoff	Innere Medizin	
Prof.Dr. Hittmair	"	"
Prof.Dr. Heintz	"	"
Prof.Dr. Schrade	"	"
Prof.Dr. Fischer	"	"
Prof.Dr. Pfeiffer	"	"
Prof.Dr. Schöffling	"	"
Prof.Dr. Christ	"	"

Prof.Dr. Jürgens	Innere Medizin
Prof.Dr. Radenbach	" "
Prof.Dr. Altmann	" "
Prof.Dr. Martin	" "
Prof.Dr. Halhuber	" "
Prof.Dr. Geissendörfer	Chirurgie
Prof.Dr. Huber	"
Prof.Dr. Ungeheuer	"
Prof.Dr. Weber	"
Prof.Dr. Schwenzer	Frauenheilkunde
Prof.Dr. Tapfer	"
Prof.Dr. Heller	"
Prof.Dr. de Rudder	Kinderheilkunde
Prof.Dr. Asperger	"
Prof.Dr. Thiel	Augenheilkunde
Prof.Dr. Otto	"
Prof.Dr. Lieb	"
Prof.Dr. Mittermaier	Hals- Nasen- Ohrenheilk.
Prof.Dr. Boenninghaus	" " "
Prof.Dr. Herrmann	Haut- u.Geschlechtskrankh.
Prof.Dr. Landes	" "
Prof.Dr. Zutt	Psychiatrie u.Neurologie
Prof.Dr. Degkwitz	" "
Priv.doz.Dr. Frowein	" "
Prof.Dr. Güntz	Orthopädie
Prof.Dr. Herzberg	Hygiene u.Bakteriologie
Prof.Dr. Betke	Arbeits- u.Sozialhygiene
Prof.Dr. Schmith	Gesundheitsfürsorge
Prof.Dr. Amelung	Naturheilkunde
Prof.Dr. Wiedemann	"
Prof.Dr. Wiethold	Ärztl.Rechts-u.Berufskunde
Prof.Dr. Luff	Gerichtsmedizin
Prof.Dr. Grüner	"
Prof.Dr.Dr.Dr. Artelt	Geschichte der Medizin

Prof.Dr. Hellriegel	Strahlenkunde
Prof.Dr. Rajewsky	"
Prof.Dr. Strnad	"
Prof.Dr. von Reckow	Zahnheilkunde

